

**Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular**

**FUNCIÓN TOLEROGÉNICA,
ORIGEN Y DIFERENCIACIÓN
DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS
PLASMACITOIDES RESIDENTES EN
EL TIMO HUMANO**

TESIS DOCTORAL

**ENRIQUE MARTÍN GAYO
Madrid, 2010**

Directora: Dra. María Luisa Toribio García

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y de la Universidad Autónoma de Madrid, con financiación de los proyectos SAF2001-1629, GEN2003-20649-C06-02/NAC, SAF2004-01122 y BFU2007-60990 del Ministerio de Ciencia e Innovación; S-SAL/0304/2006 de la Comunidad de Madrid y RECAVA-RD06/0014/1012 del Instituto de Salud Carlos III. Enrique Martín Gayo ha sido financiado mediante una beca predoctoral del programa FPU del Ministerio de Ciencia e Innovación y un contrato de Personal Investigador de Apoyo de la Comunidad de Madrid. El CBMSO recibe una ayuda institucional de la Fundación Ramón Areces.

A mis padres y mi hermana,

La razón debe acudir a la naturaleza llevando en una mano sus principios, según los cuales tan sólo los fenómenos concordantes pueden tener el valor de leyes, y en la otra el experimento, pensado según aquellos principios; así conseguirá ser instruida por la naturaleza, mas no en calidad de discípulo que escucha todo lo que el maestro quiere, sino en la de juez autorizado, que obliga a los testigos a contestar a las preguntas que les hace...

Kant - Crítica de la Razón pura -

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Marisa por darme la oportunidad de realizar mi Tesis Doctoral en su grupo y enseñarme el verdadero sentido de hacer Ciencia, la necesidad de ser autocrítico y de no darse por vencido.

En segundo lugar, quiero agradecer a mis padres, Pilar y Miguel Ángel, y a mi hermana Cristina, su apoyo incondicional durante todos estos años de estudiante predoctoral. A través de este trabajo, mi intención ha sido poder corresponderos por vuestro cariño (y muchas veces paciencia) y que os sintáis un poco más orgullosos de mí. Os quiero.

A Carmela, Yolanda, Cristina, David, Vir, Aal, Avo, Carla, Alicia, Dani, Álvaro y Rúnar, gracias por haber estado a mi lado de un modo u otro, esta Tesis también es vuestra.

Por supuesto, no puedo dejar de dar las gracias a todos mis compañeros del laboratorio. He tenido una suerte increíble de tener la oportunidad de trabajar con vosotros y para mí, sois ya amigos. Quisiera agradecer personalmente: a Marina, que se hizo cargo de mí cuando entré en el laboratorio y se ha convertido en alguien muy especial, muchas gracias por tantos momentos y por decirme siempre las verdades, aunque a veces no quiera escucharlas. A Sara, cómplice en “la vida de becario” y de la que además, siempre he admirado su serenidad y su buen hacer. A Patricia, cuya energía y optimismo siempre han llenado de energía positiva el laboratorio y cuya generosidad con los demás no se encuentra todos los días. A Juanito, el Super Técnico que lo hace todo posible, sabes que sin ti no soy nadie. Gracias por estar ahí para ayudarme en cualquier situación. A las incorporaciones más recientes, Marta, que siempre tiene una sonrisa y está dispuesta a apuntarse a un bombardeo, Chus, con la que comparto inquietudes tanto científicas y artísticas, y Teresa, nuestra aprendiz de técnico. No quisiera olvidarme de aquellas personas con las que he coincidido en el laboratorio y que actualmente no forman parte del grupo: María, “mi hermana mayor”, una currante y una chica excepcional; Almu, cuyos consejos científicos y no-científicos siempre tendré en cuenta; Virginia, predecesora de este trabajo y un ejemplo a seguir; Sara P, buena compañera y confidente; Gretel, otra de mis “mamás”, y buena consejera; Tiziana, mi “bambina” y compañera de escritorio, gracias por tus ánimos y la pasión que le pones a todo.

También quiero agradecer a María Luisa Gaspar, Belén de Andrés y Mario Ali cuya colaboración en este estudio ha permitido realizar una gran parte de los experimentos.

No puedo dejarme a todos los compañeros de otros laboratorios y servicios del CBM. En especial, gracias a todos los “Balbino” (Balbino, Aldo, Elena, Enrique, Hisse, Irene María, Nuria y Raquel), los “López” (Jose Antonio, Carlos, Noel, Bego, Lorena, Patricia, Alejandro), los “MAL” (Juanfra y Olga) y los “Alcamí” (Sergio y Nadia), gracias por vuestra ayuda y miles de momentos buenos, ya sabéis que sois de la familia. Gracias a Berta y Silvia en el Servicio de Citometría, sin vuestro trabajo estaríamos perdidos.

Por último, quisiera recordar a Miguel Ángel Rodríguez Marcos, que nos dejó recientemente. Siempre le agradeceré su visión crítica y entusiasmo, y más personalmente, su siempre abierta disposición a aportar ideas y ayudar en mi proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	10-12
ABREVIATURAS.....	13-15
SUMMARY.....	17
INTRODUCCIÓN.....	19-40
1. Linfocitos T.....	20
1.1. <i>El timo como órgano regulador del desarrollo de los linfocitos T.....</i>	<i>20</i>
1.2. <i>Plasticidad del linaje de linfocitos T CD4⁺.....</i>	<i>22</i>
2. Células T reguladoras.....	23
2.1. <i>Identificación y función de las células Treg.....</i>	<i>23</i>
2.2. <i>Subtipos de células Treg.....</i>	<i>25</i>
2.2.1. <i>Células nTreg.....</i>	<i>25</i>
2.2.2. <i>Células iTreg.....</i>	<i>26</i>
3. Células dendríticas.....	28
3.1. <i>Función y subtipos de DCs.....</i>	<i>28</i>
3.2. <i>DCs intratímicas.....</i>	<i>29</i>
3.3. <i>Linaje de las DCs.....</i>	<i>30</i>
3.3.1. <i>Origen de las DCs intratímicas humanas.....</i>	<i>33</i>
3.3.2. <i>Factores reguladores de la diferenciación del linaje de pDCs.....</i>	<i>34</i>
4. Receptores Notch.....	37
4.1. <i>Receptores Notch y ligandos.....</i>	<i>37</i>
4.2. <i>Notch en hematopoyesis.....</i>	<i>38</i>
4.2.1. <i>Implicación de Notch en el desarrollo de DCs.....</i>	<i>39</i>
OBJETIVOS.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44-55
1. Selección de poblaciones celulares.....	44
1.1. <i>Aislamiento de poblaciones de timo postnatal humano.....</i>	<i>44</i>
1.1.1. <i>Progenitores multipotenciales TLMPs CD34^{hi} CD1a⁻.....</i>	<i>44</i>
1.1.2. <i>Células dendríticas plasmacitoides y convencionales.....</i>	<i>45</i>
1.1.3. <i>Timocitos CD4SP CD25⁻, DP CD69^{lo} pequeños, DP CD69^{hi} grandes.....</i>	<i>45</i>
1.2. <i>Aislamiento de linfocitos T CD4⁺ CD25⁻ de sangre periférica.....</i>	<i>45</i>

1.3. Aislamiento de poblaciones de progenitores intermediarios $CD5^{hi} CD123^{-}$ y $CD5^{lo} CD123^{+}$ generados <i>in vitro</i>	46
2. Análisis por citometría de flujo.....	46
2.1. Marcaje de antígenos de membrana.....	46
2.2. Marcaje de antígenos intracelulares.....	47
2.3. Citómetro y análisis de datos.....	47
2.4. Resumen de anticuerpos utilizados para los estudios de citometría de flujo.....	47
3. Sistemas de cultivo de células primarias humanas.....	49
3.1. Sistemas de diferenciación <i>in vitro</i> de progenitores $CD34^{+}$ TLMPs de timo humano.....	49
3.2. Activación de células dendríticas intratímicas <i>in vitro</i>	50
3.3. Generación de células Treg <i>in vitro</i>	50
4. Ensayos funcionales.....	51
4.1. Análisis de la función supresora de las células Treg generadas <i>in vitro</i>	51
4.2. Inducción de la expresión de CD40L en timocitos L-DPCD69 ^{hi} y activación de pDCs dependiente de CD40L.....	52
5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	52
5.1. PCR semicuantitativa.....	52
5.2. PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).....	53
6. Técnicas de inmunohistoquímica.....	54
6.1. Tinción de células T reguladoras, células epiteliales y células dendríticas plasmacitoides en secciones de timo humano.....	54
6.2. Adquisición y análisis de imágenes por microscopía confocal.....	55
7. Análisis estadístico.....	55
RESULTADOS.....	57-101
I. DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS nTreg HUMANAS: FUNCIÓN TOLEROGÉNICA DE LAS pDCs INTRATÍMICAS.....	57-78
1. Caracterización de las DCs intratímicas y de sus factores de activación.....	57
1.1 Identificación de poblaciones de pDCs y cDCs inmaduras y pDCs activadas residentes en el timo humano.....	57

1.2. Las pDCs y cDCs inmaduras residentes en el timo humano se activan en respuesta a diferentes estímulos.....	59
2. Capacidad tolerogénica de las pDCs de timo humano. Implicación en la generación de nTregs.....	60
3. Los precursores de las células nTreg son timocitos DP CD69^{hi} TCRαβ^{hi}	64
3.1. CD69 y TCRαβ definen dos poblaciones de timocitos DP residentes en el timo humano.....	64
3.2. Los timocitos DP CD69 ^{hi} TCRαβ ^{hi} generan células nTregs en presencia de pDCs autólogas maduras.....	67
4. Las pDCs y cDCs intratímicas inducen la diferenciación de dos tipos funcionales de células nTreg.....	69
4.1. Las pDCs y cDCs activadas inducen la diferenciación de células nTreg con distintos patrones de producción de citoquinas.....	69
4.2. La capacidad tolerogénica de MpDCs y McDCs es dependiente de la co-estimulación mediada por CD80/CD86.....	71
5. La activación a través del TCR induce la diferenciación de células nTreg mediante un mecanismo de retroalimentación dependiente de CD40L.....	74
5.1. La activación de progenitores nTreg vía TCR induce la expresión de CD40L y produce la activación de pDCs autólogas.....	74
5.2. Las pDCs y las células nTreg co-localizan en la región medular del timo humano.....	76
II. ORIGEN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS pDCs INTRATÍMICAS.....	79-101
1. Los progenitores multipotenciales de timo humano (TLMP) generan pDCs y cDCs <i>in vitro</i>	79
2. Las células pDCs y cDCs intratímicas comparten un progenitor intermediario mieloide CD34^{lo} CD5^{lo} CD123⁺	82
2.1. La expresión diferencial del marcador de pDCs CD123 define dos tipos de progenitores intermediarios, de fenotipo linfóide o mieloide, derivados de los precursores multipotenciales TLMPs.....	82

2.2. Patrones de expresión génica de los progenitores intermediarios $CD5^{lo} CD123^{+}$ y $CD5^{hi} CD123^{-}$ derivados de TMLPs: expresión selectiva de genes asociados al linaje mieloide y a DCs en los progenitores $CD5^{lo} CD123^{+}$	83
2.3. Los progenitores de las pDCs intratímicas residen específicamente en la población de precursores intermediarios mieloides $CD5^{lo} CD123^{+}$	86
2.4. Los progenitores mieloides $CD123^{+}p$ y linfoides $CD5^{+}p$ generan células NK en respuesta a diferentes citoquinas.....	88
3. Implicación de la vía de señalización de Notch en el desarrollo de las DCs intratímicas humanas. Papel diferencial de los ligandos <i>DLL1</i> y <i>JAG1</i>.....	90
3.1. Los progenitores mieloides $CD123^{+}p$ expresan un patrón específico de receptores Notch y su generación está diferencialmente regulada por <i>DLL1</i> y <i>JAG1</i>	90
3.2. Ambos ligandos de Notch, <i>DLL1</i> y <i>JAG1</i> , promueven la supervivencia de los progenitores inmediatos $CD123^{+}p$ de las DCs.....	91
3.3. <i>DLL1</i> y <i>JAG1</i> regulan diferencialmente la generación de pDCs y cDCs a partir de sus progenitores mieloides $CD123^{+}p$	95
3.4. <i>DLL1</i> y <i>JAG1</i> inhiben la generación de células NK a partir de sus progenitores mieloides $CD123^{+}p$	96
4. Identificación de nuevos patrones de expresión génica en el linaje de pDCs intratímicas. Regulación diferencial por <i>DLL1</i> y <i>JAG1</i>.....	98
4.1. <i>AIOLOS</i> y <i>PAX 5</i> se expresan específicamente en las pDCs del timo humano.....	98
4.2. <i>JAG1</i> y <i>DLL1</i> regulan diferencialmente la expresión de <i>SPIB</i> y <i>AIOLOS</i>	100
DISCUSION.....	103-121
1. Implicación de las pDCs intratímicas en la generación de nTregs humanas.....	103
1.1. Identificación de los progenitores fisiológicos de las nTregs humanas y potencial tolerogénico de las pDCs residentes en el timo humano.....	103
1.2. Mecanismos fisiológicos de activación de las pDCs intratímicas.....	105
1.3 Contribución de las pDCs intratímicas a la generación de células nTreg in vivo.....	108

1.4. Mecanismos moleculares implicados en la capacidad de las pDCs y las cDCs intratímicas de inducir la generación de subtipos de células nTregs humanas con capacidades funcionales distintas.....	109
2. Estudio del origen de las pDCs intratímicas humanas, su relación con los linajes de cDCs y NKs, y la participación de la vía de Notch como posible regulador de su generación en el timo.....	112
2.1. Identificación de las rutas madurativas implicadas en la generación de pDCs a partir de progenitores TLMPs multipotenciales de timo humano.....	112
2.2. Diferencias en el potencial NK de los progenitores intermediarios mieloides CD123 ⁺ p y linfoides CD5 ⁺ p.....	114
2.3. Regulación diferencial de la generación de DCs, NKs intratímicas y sus progenitores por distintos ligandos de Notch.....	115
2.4. La activación de Notch vía DLL1 o JAG1 regula diferencialmente la expresión de genes asociados al linaje de pDCs.....	120
CONCLUSIONES.....	123-124
BIBLIOGRAFÍA.....	126-145
ANEXO.....	147

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Esquema de la diferenciación de linfocitos T “ $\alpha\beta$ ” humanos.....	22
Figura 2. Subtipos de linfocitos T.....	23
Figura 3. Mecanismos implicados en la generación de nTregs e iTregs.....	28
Figura 4. Esquema de la ontogenia de las DCs residentes en la MO.....	32
Figura 5. Modelo de desarrollo de las poblaciones T y no-T presentes en el timo humano.....	33
Figura 6. Factores implicados en la regulación de la diferenciación de pDCs.....	36
Figura 7. Familia de receptores Notch, ligandos y su vía de señalización.....	37
Figura 8. En el timo humano residen pDCs y cDCs inmaduras junto con pDCs activadas.....	58
Figura 9. Las pDCs y cDCs intratímicas se activan en respuesta a distintos estímulos.....	60
Figura 10. Fenotipo de timocitos CD4SP y linfocitos CD4PB tras su aislamiento.....	61
Figura 11. Las pDCs intratímicas adquieren potencial tolerogénico tras su activación con CD40L e IL-3.....	62
Figura 12. Las poblaciones de timocitos DP grandes o pequeños están diferencialmente enriquecidas en células TCR ^{hi} CD69 ^{hi} y no contienen nTregs CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	65
Figura 13. Las pDCs activadas inducen la generación de células nTregs a partir de timocitos autólogos DP CD69 ^{hi} TCR $\alpha\beta$ ^{hi} que han sido seleccionados positivamente.....	66
Figura 14. Los progenitores de Tregs residen específicamente en la población de células L-DP CD69 ^{hi}	67
Figura 15. Los timocitos L-DP CD69 ^{hi} inducen la expresión de CD25 y Foxp3 en respuesta a MpDCs y se diferencian en células CD4 ⁺ CD8 ⁻	68
Figura 16. Las pDCs y cDCs de timo humano inducen la diferenciación de células nTreg con perfiles distintos de expresión de citoquinas.....	70
Figura 17. El timo humano contiene dos subtipos de células nTreg con diferente expresión de ICOS.....	71
Figura 18. ICOS se induce durante la diferenciación de los timocitos L-DP en células nTreg e ICOSL se expresa en DCs intratímicas activadas.....	72

Figura 19. La capacidad de MpDCs y McDCs de inducir la diferenciación de nTregs a partir de timocitos L-DP CD69 ^{hi} es dependiente de la función de los co-receptores CD80 y CD86.....	73
Figura 20. Los timocitos L-DP CD69 ^{hi} transcriben CD40L <i>in vivo</i> y lo expresan en la superficie tras la activación vía TCR, lo que los capacita para inducir la activación de pDCs autólogas.....	75
Figura 21. Las células Foxp3 ⁺ se localizan en la médula del timo humano.....	77
Figura 22. Las células nTreg Foxp3 ⁺ y las pDCs CD123 ⁺ co-localizan en la médula del timo humano donde establecen interacciones celulares.....	78
Figura 23. Fenotipo de progenitores multipotenciales TLMPs aislados de timo humano.....	79
Figura 24. Los progenitores multipotenciales TLMPs de timo humano generan pDCs y cDCs <i>in vitro</i> con cinéticas diferentes.....	81
Figura 25. Los progenitores TLMPs de timo generan dos poblaciones de precursores intermediarios: linfoides CD5 ^{hi} CD123 ⁻ y mieloides CD5 ^{lo} CD123 ⁺	82
Figura 26. Los progenitores CD5 ^{lo} CD123 ⁺ y CD5 ^{hi} CD123 ⁻ presentan diferentes patrones de expresión de genes asociados a las estirpes linfoides y mieloides y al linaje de DCs.....	85
Figura 27. Las pDCs y cDCs se originan simultáneamente a partir de TLMPs a través de progenitores intermediarios mieloides CD5 ^{lo} CD123 ⁺ incluidos <i>in vivo</i> en la población de timocitos CD34 ^{lo} CD33 ⁺	87
Figura 28. Los progenitores CD123 ⁺ p y CD5 ⁺ p generan células NK en respuesta a diferentes citoquinas.....	89
Figura 29. Los progenitores CD123 ⁺ p poseen un patrón específico de expresión de receptores Notch y su generación está diferencialmente regulada por DLL1 y JAG1.....	92
Figura 30. DLL1 y JAG1 inducen la supervivencia de los progenitores mieloides CD123 ⁺ p.....	94
Figura 31. DLL1 y JAG1 soportan la diferenciación de pDCs y cDCs, a partir de sus precursores inmediatos CD123 ⁺ p.....	96
Figura 32. DLL1 y JAG1 no afectan a la proliferación ni a la supervivencia de DCs y NKs generadas a partir de células CD123 ⁺ p.....	97
Figura 33. DLL1 y JAG1 inhiben la generación de células NK a partir de sus progenitores CD123 ⁺ p.....	98
Figura 34. AIOLOS y PAX5 se expresan a niveles elevados en las pDCs residentes en el timo humano.....	99
Figura 35. DLL1 y JAG1 inducen diferencialmente la expresión de SPIB y AIOLOS en los precursores de las pDCs.....	101

Figura 36. Modelo de la generación de nTregs en el timo humano.....	111
--	------------

Figura 37. Modelo de la regulación por DLL1 y JAG1 de la generación de DCs y NKs intratímicas.....	119
---	------------

TABLAS

Tabla 1. Resumen de las interacciones de receptores Notch con sus ligandos canónicos.....	38
--	-----------

Tabla 2. Relación de anticuerpos utilizados en citometría de flujo.....	47-49
--	--------------

Tabla 3. Resumen de las sondas TaqMan utilizadas en los ensayos de Q-PCR.....	53
--	-----------

Tabla4. Genes expresados diferencialmente en las poblaciones de progenitores intermediarios CD123 ⁺ p y CD5 ⁺ p.....	84
--	-----------

ABREVIATURAS

³H-Thy, Timidina Titiada
ADN, Ácido Desoxirribonucleico
Ag, Antígeno
APC, Aloficocianina (*Allophycocyanin*)
APC, Célula presentadora de antígeno (*Antigen Presenting Cell*)
ARN, Ácido Ribonucleico
BCR, Receptor de antígeno del linfocito B (*B Cell Receptor*)
bHLH, *Basic Helix-Loop-Helix*
BSA, Albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)
c.p.m., Cuentas por minuto
CD, Complejo de diferenciación (*Cluster of Differentiation*)
CD123⁺p, Progenitores intermediarios mieloides CD123⁺
CD4ISP, Timocitos inmaduros simples positivos CD4⁺ CD8⁻
CD5⁺p, Progenitores intermediarios linfoides CD5⁺
cDC, Célula dendrítica convencional (*Conventional Dendritic Cell*)
CDCP, Progenitor común de células dendríticas (*Common Dendritic Cell Progenitor*)
CFSE, *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*
CLP, Progenitor común linfóide (*Common Lymphoid Progenitor*)
CMP, Progenitor común mielóide (*Common myeloid Progenitor*)
cTEC, Célula epitelial intratímica residente en la corteza
CTLA4, Antígeno citotóxico del linfocito T
Cytok, Citoqueratina
DC, Célula dendrítica (*Dendritic Cell*)
DLL, Ligando de Notch tipo Delta (*Delta-like*)
DN, Doble negativo CD4⁻ CD8⁻
DP, Doble positivo CD4⁺ CD8⁺
EDTA, Ácido etilendiaminotetraacético
FACS, Separación de células activadas por fluorescencia (*Fluorescence Activated Cell Sorting*).
FBS, Suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum*)
FITC, Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*)
Foxp3, *Forkhead box P3*
GAPDH, Gliceroaldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFP, Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)
GITR, Familia de receptores del factor de necrosis tumoral inducidos por glucocorticoides (*Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor family*)
GM-CSF, Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*)
GMP, Progenitor de granulocitos y monocitos/macrófagos
HES, *Hairy and Enhancer of Split homolog*
hi, Expresión elevada (*high*)
HLA, Antígeno leucocitario humano (*Human Leukocyte Antigen*)
HNS, Suero normal humano (*Human Normal Serum*)
HSC, Célula madre hematopoyética (*Hematopoietic Stem Cell*)
ICOS, Molécula coestimuladora inducible (*Inducible costimulatory molecule*)

Id, Inhibidor de la unión al ADN (*Inhibitor of DNA binding*)
IF, Intensidad de fluorescencia
Ig, Inmunoglobulina
IL, Interleuquina
IpDC, Célula dendrítica plasmacitoide inmadura
IRF, Factor regulador de interferón (*Interferon regulatory factor*)
iTreg, Célula T reguladora inducida
IU, Unidades internacionales (*International Units*)
JAG, Ligando de Notch de la familia “irregular o con picos” (*Jagged*)
KO, Deficiente (*Knock out*)
L, Ligando
L-DP, Timocito DP grande (*Large-DP thymocyte*)
LMPP, Progenitor multipotencial instruido hacia el linaje linfoide (*Lymphoid-primed multipotent progenitor*)
lo, Expresión baja (*low*)
LT-HSC, Célula madre hematopoyética con capacidad de reconstitución a largo plazo (*Long Term Hematopoietic Stem Cell*)
MAML, *Mastermind-like*
McDC, Célula dendrítica convencional activada
M-CSF, Factor estimulante de colonias de macrófagos (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*)
MHC, Complejo principal de histocompatibilidad (*Main Histocompatibility Complex*)
MIF, Media de intensidad de fluorescencia
min, Minutos
MKEP, Progenitor de linaje megacariocítico-eritroide.
MO, Médula ósea
Mo, Monocito
MpDC, Célula dendrítica plasmacitoide activada
Mφ, Macrófago
mTEC, Célula epitelial intratímica medular
NK, Asesina natural (*Natural Killer*)
nTreg, Célula T reguladora natural
PAMP, Patrón molecular asociado a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)
PBS, Tampón fosfato
PC5, Ficoeritrina-cianina (*Phycoerythrin Cyanin 5.1*)
PCR, Reacción en cadena de la polimerasa
pDC, Célula dendrítica plasmacitoide (*Plasmacytoid dendritic cell*)
PE, Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)
pM, Progenitor mieloide
PPR, Receptor de reconocimiento de patrones PAMPs
preTCR, Pre-receptor de las células T
Q-PCR, PCR cuantitativa a tiempo real
R, Receptor
RAG, Gen activador de recombinación (*Recombination Activating Gene*)
rh, Recombinante humana
SD, Desviación estándar (*Standard deviation*)
S-DP, Timocito DP pequeño (*Small-DP thymocyte*)

SEM, Error estándar de la media (*Standard Error of the Mean*)

SI, Sistema Inmunitario

SP, Simple positivo CD4⁺ CD8⁻ o CD4⁻ CD8⁺

ST-HSC, Célula madre hematopoyética con capacidad de reconstitución a corto plazo (*Short Term Hematopoietic Stem cell*)

TC, tri-color

TCR, Receptor de antígeno del linfocito T (*T Cell Receptor*)

TEC, Célula epitelial intratímica (*Thymic Epithelial Cell*)

TGF, Factor de crecimiento transformante (*Transforming growth factor*)

TH, T colaborador (*T helper*)

TLMP, Progenitor multipotencial linfo-mieloide intratímico

Treg, Célula T reguladora

TSLP, Linfopoyetina derivada del estroma tímico (*Thymic Stromal Lympho-Poietin*)

SUMMARY

SUMMARY

The generation of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ “natural” regulatory T cells (nTregs) in the thymus is fundamental for the establishment of immunological self-tolerance and the prevention of autoimmunity. Thymic dendritic cells (DCs) have been proposed to be involved in this process, although the particular contribution of the two main subtypes of thymic DCs; *i.e.*, conventional (cDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs), is still unclear. To approach this issue we have developed in this study an *in vitro* experimental system that allowed us to confirm the tolerogenic potential of both cDCs and pDCs resident in the human thymus, as they were able to induce the generation of autologous nTregs upon activation in response to different stimuli: either the cytokine Thymic Stroma Lymphopoietin or the combination of CD40 ligand (CD40L) plus IL-3, respectively. Interestingly, the progenitors of nTregs are identified within the subset of CD4⁺ CD8⁺ double positive (DP) thymocytes that have accomplished positive selection, as judged by their CD69^{hi} TCR^{hi} phenotype. Supporting the involvement of the CD40-CD40L pathway in pDC-induced nTreg generation, positively-selected DP progenitors specifically transcribe CD40L *in vivo* and up-regulate CD40L protein expression upon TCR engagement, thereby promoting the activation of pDCs. The physiological relevance of these findings is supported by the identification of Treg-pDC interactions *in vivo* in the steady-state human thymus. Also, evidence is provided that nTregs primed by either pDCs or cDCs are both dependent on the CD28-CD86/CD80 signalling pathway for their development, although they display a reciprocal IL-10/TGFβ cytokine expression profile that supports a non-redundant tolerogenic role for thymic pDCs and cDCs in the human thymus.

Also, the functional relevance of intrathymic DCs prompted us to investigate the mechanisms that govern their development in the thymus. We found that thymic cDCs and pDCs differentiate from thymic multipotent progenitors (TLMPs) through the generation of intermediate progenitors that display phenotypic and genetic features of myeloid cells. Such myeloid progenitors, identified as CD123⁺ CD5^{lo}, express DC-related genes and still display NK potential, but have lost the capability to generate T cells. Since T-cell commitment is induced during thymopoiesis at the expense of non-T cell lineages through the Notch signalling pathway, we next analysed the impact of Notch-ligand interactions on the generation of the myeloid DC/NK progenitor subset. We show that signalling induced by the Notch ligand Delta-like-1 (DLL1) impairs the development of CD123⁺ CD5^{lo} myeloid progenitors from TLMPs, while Jagged-1 (JAG1) is permissive. Once generated, both DLL1 and JAG1 ligands promote the survival of these progenitors, but block their differentiation into NK cells and differentially regulate their development into pDCs. In fact, while DLL1 promotes cDCs but not pDCs differentiation, both DC subtypes are induced by JAG1-mediated signalling. Moreover, JAG1, but not DLL1, induces the expression of genes selectively linked to the pDC lineage, such as *SPIB* and *AILOS*, in the myeloid immediate progenitors of DCs. These results provide evidence that Notch signalling controls the development of intrathymic DCs in a stage-specific manner and suggest that the spatial regulation of JAG1 *vs* DLL1 expression in the human thymic microenvironment could provide specific niches for inducing the final fate of pDC/cDC/NK progenitors.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El sistema inmunitario (SI) tiene como principal función proteger a los organismos de las agresiones provocadas por patógenos externos. Durante la evolución, el SI ha desarrollado dos mecanismos de respuesta que actúan de forma coordinada para mantener nuestra integridad: la inmunidad innata, que permite una actuación rápida y relativamente inespecífica, y la inmunidad adaptativa o adquirida, tardía pero altamente específica (Moser y Leo, 2010).

El sistema innato está conformado por tipos celulares tales como las células dendríticas (DCs; del inglés, *dendritic cells*), monocitos (Mos), macrófagos (M ϕ) y otras células fagocíticas capaces de responder rápidamente a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMS; del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) a través de receptores específicos conocidos como PPRs (del inglés; *Pattern-Recognition Receptors*) (Areschoug y Gordon, 2008). Estos tipos celulares inician procesos inflamatorios cuya función es tratar de acabar con la infección y colaborar con la posterior respuesta adaptativa (Dunkelberger y Song, 2010). Además, este sistema cuenta con células NK (del inglés, *Natural Killer*) que poseen receptores capaces de reconocer células infectadas por virus (Bianconi et al., 2009; Höglund y Brodin; 2010; López-Botet et al., 1996).

Por su parte, el sistema adaptativo está principalmente conformado por linfocitos B y linfocitos T (de bursa y timo, respectivamente). Estos tipos celulares inducen una respuesta más tardía que la innata, consistente en la activación de clones específicos capaces de dar una respuesta personalizada al patógeno, y de generar memoria inmunológica. La acción del sistema adaptativo implica la cooperación de dos subtipos de respuestas en las que intervienen linfocitos B o T activados, denominadas respuesta humoral y respuesta celular, respectivamente. Los linfocitos B poseen receptores BCR (del inglés *B-Cell Receptor*) que reconocen específicamente al microorganismo causante de la infección y son capaces de generar anticuerpos que se unen a él y que activan a otros componentes del SI, como el complemento. Los linfocitos T poseen receptores TCR (del inglés *T-Cell Receptor*) capaces también de reconocer diversos tipos de patógenos, y se encargan de dirigir la respuesta celular. Esta respuesta está mediada por células T especializadas en secretar citoquinas capaces de activar células B (linfocitos T CD4⁺ cooperadores, TH, del inglés *T Helper*) o en destruir directamente células infectadas por virus y también células tumorales (linfocitos T

CD8⁺ citotóxicos, TC) (Alam, 1998; Bonilla y Oettgen, 2010; Dudley, 1992; Dunkelberger y Song, 2010; McHeyzer-Williams et al., 2000).

Las respuestas innata y adaptativa se encuentran estrechamente conectadas. Sin embargo, tras más de un siglo de intensa investigación, aún no se conocen con precisión los mecanismos moleculares responsables de la generación de algunos de los tipos celulares que las desencadenan.

1. Linfocitos T.

1.1. El timo como órgano regulador del desarrollo de los linfocitos T.

Todos los tipos celulares presentes en la sangre se originan a partir de un progenitor hematopoyético común denominado “célula madre hematopoyética” o HSC (del inglés; *Hematopoietic Stem Cell*). Estos progenitores se caracterizan por ser multipotenciales y poseer capacidad de autorenovación (Spangrude et al., 1988). Durante la vida postnatal, las HSCs residen en la médula ósea (MO), donde son capaces de autorrenovarse y de generar progenitores intermediarios que han perdido su capacidad multipotente y que están comprometidos a generar sólo determinados tipos celulares (Adolfsson et al., 2001; Akashi et al., 2000; Kondo et al., 1997 y 2001; Morrison et al., 1997). Sin embargo, los precursores de las células T han de abandonar la MO y colonizar otro órgano, el timo, donde dan lugar a linfocitos T maduros (Jenkinson et al., 1980).

Durante su proceso de diferenciación, los precursores que colonizan el timo interaccionan con las células epiteliales tímicas (TEC) y pasan por diversos estadios madurativos que finalmente llevan al reordenamiento de los genes que codifican el receptor antigénico: TCR α y TCR β o TCR γ y TCR δ , dando lugar a linfocitos T maduros con receptores TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$, respectivamente. Dichos reordenamientos garantizan la generación de un repertorio diverso de células T con TCRs capaces responder a cualquier tipo de antígeno (Ag). Sin embargo, este proceso entraña el riesgo de generar autoinmunidad.

Para evitar la posible generación de células T autorreactivas y establecer lo que se conoce como tolerancia central, los linfocitos T han de sufrir un proceso de selección durante su desarrollo en el timo. En la actualidad, este proceso se entiende mejor en el linaje de las células T “ $\alpha\beta$ ”, siendo menos conocido para las células T “ $\gamma\delta$ ”. En humanos, los progenitores intratímicos CD34⁺ dobles negativos CD4⁻CD8⁻ (DN) que darán lugar a las células de linaje

T “ $\alpha\beta$ ”, se diferencian en primer lugar en timocitos inmaduros $CD4^+$ (CD4ISP) en los que se inician los reordenamientos en el *locus* TCR β (Figura 1). A continuación, sólo aquellos timocitos inmaduros que han reordenado una cadena TCR β funcional serán capaces de diferenciarse en células dobles positivas $CD4^+CD8^+$ (DP) pre-T que expresan en la membrana un complejo denominado pre-TCR, formado por la cadena TCR β y una cadena invariante pT α (Figura 1). El pre-TCR señala a la célula de forma autónoma, independientemente de ligando, e induce su selección y rescate de apoptosis, su expansión, la exclusión alélica en el *locus* TCR β y el inicio de los reordenamientos en el *locus* TCR α (Aifantis et al., 1997; Ramiro et al., 1996; Trigueros et al., 1998). Tras la expresión de un TCR $\alpha\beta$ funcional, los timocitos DP han de ensayar su capacidad de reconocer Ags propios proporcionados por células presentadoras (APC; del inglés *Antigen Presenting Cell*), unidos al complejo principal de histocompatibilidad (MHC; del inglés *Major Histocompatibility Complex*). En una primera etapa, sólo aquellos timocitos capaces de reconocer Ags propios presentados por TECs de la corteza tímica (cTECs) son seleccionados positivamente, mientras que el resto de células mueren por apoptosis. A continuación, los timocitos DP seleccionados migran a la médula tímica, donde las TECs medulares (mTECs) y las DCs residentes se encargan de eliminar aquellos clones que reconocen Ags propios con afinidades altas, en un proceso conocido como “selección negativa” (Kisielow y von Boehmer, 1990; Sprent et al., 1988). Como consecuencia de ambos procesos selectivos, se produce la generación de timocitos simples positivos (SP) $CD8^+CD4^-$ (CD8SP) o $CD4^+CD8^-$ (CD4SP) que reconocen Ags propios con afinidades intermedias presentados por MHC de clase I o clase II, respectivamente (Figura 1). Estas células pasan posteriormente a la sangre como linfocitos T efectores “vírgenes”, preparados para iniciar una respuesta inmunitaria.

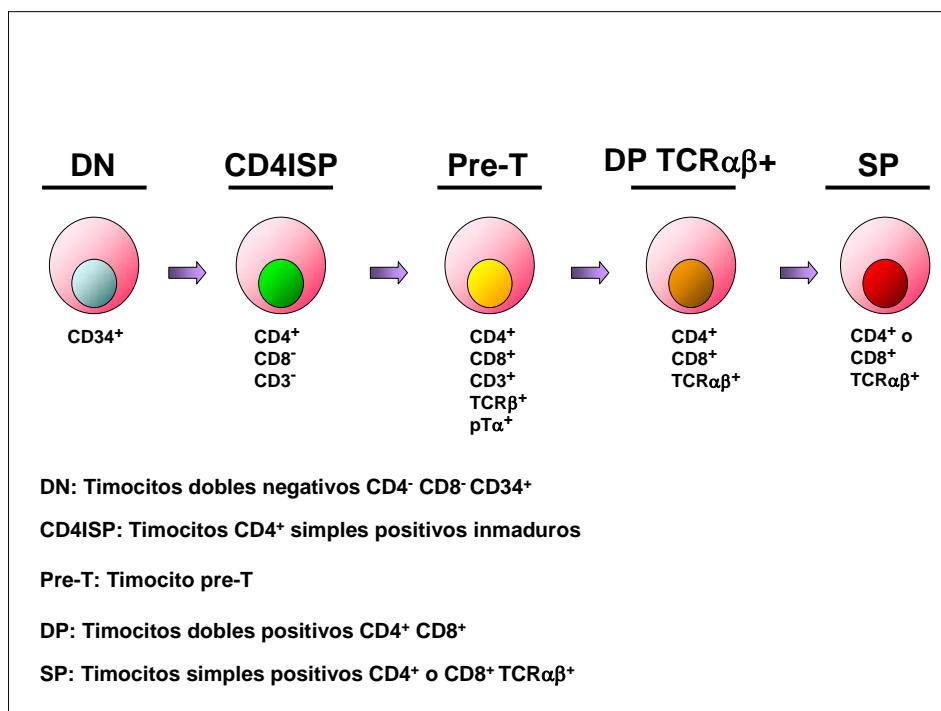


Figura 1. Esquema de la diferenciación de linfocitos T “αβ” humanos.

1.2. Plasticidad del linaje de linfocitos T CD4⁺.

Entre las poblaciones de linfocitos T efectores periféticos, los linfocitos T CD4⁺ han sido los más estudiados. Durante décadas se ha sabido que los linfocitos T CD4⁺ vírgenes tienen la capacidad de diferenciarse durante su proceso de activación en células efectoras TH1 o TH2, dependiendo de las señales recibidas desde la APC con la que interaccionan en los órganos linfoides periféticos. Este proceso resulta en la generación de linfocitos T activados que secretan citoquinas de tipo TH1, tales como el IFNγ, el TNFα y la IL-2, o de tipo TH2 como la IL-4 y la IL-5, que determinan el tipo de respuesta efectora que va a darse (del Prete, 1998; Romagnani 1997). Sin embargo, este paradigma no explica diversos aspectos de la respuesta inmunitaria relacionados con el control y terminación de la misma, o la aparición de situaciones patológicas asociadas a procesos autoinmunes.

En los últimos años, se han identificado nuevos subtipos de células T CD4⁺, cuya función fisiológica difiere radicalmente de la descrita para las poblaciones efectoras de linfocitos TH1 y TH2 convencionales. Actualmente, se considera que los linfocitos T CD4⁺ vírgenes de la periferia tienen la capacidad de “polarizarse” e inducir la generación de diversos tipos de linfocitos T efectores, entre otros, TH1, TH2 y TH17 dependiendo de los estímulos que los condicionen (Figura 2). De este modo, los linfocitos TH tendrían la

capacidad de adaptar la respuesta inmune a cada situación patogénica (Annunziato y Romagnani, 2009; Wan, 2010). Por último, recientemente se ha descrito que los linfocitos T $CD4^+$ vírgenes también son capaces de diferenciarse en células T reguladoras (Treg), cuyo origen y función se detallará a continuación (Figura 2).

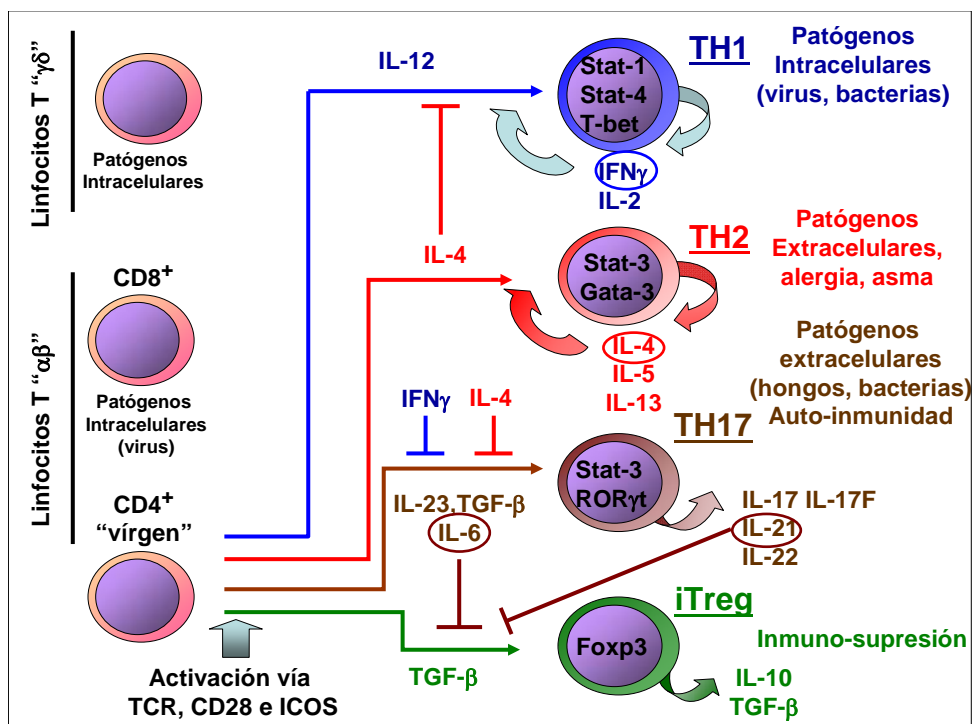


Figura 2. Subtipos de linfocitos T

2. Células T reguladoras.

2.1. Identificación y función de las células Treg.

La idea comúnmente aceptada hasta muy recientemente era que la eliminación de los linfocitos T autorreactivos en el timo y la inducción de anergia en la periferia eran mecanismos suficientes para asegurar el establecimiento de la tolerancia central y la ausencia de autorreactividad. Este paradigma cambió cuando diversos estudios en ratón revelaron la existencia de un subtipo de células intratímicas que tenían la capacidad de controlar las respuestas autoinmunes mediadas por células T efectoras y de establecer tolerancia inmunológica (Asano et al., 1996; Bonomo et al., 1995; Sakaguchi et al., 1982). Posteriormente se identificaron en la periferia células con una función reguladora similar

(Sakaguchi et al., 1995). Estas células T reguladoras fueron inicialmente caracterizadas como un subtipo de linfocitos T CD4⁺ que expresaba la cadena α del receptor de IL-2 (IL-2R α o CD25). Las células T CD4⁺CD25⁺ son capaces de suprimir respuestas inmunitarias en diferentes sistemas experimentales. Su función inmunosupresora radica en la capacidad de inhibir la proliferación y la producción de citoquinas de linfocitos T efectores a través de la secreción de TGF- β e IL-10 y de mecanismos dependientes de contacto celular (Asseman et al., 1999; Godfrey et al., 2004; Green et al., 2003; Shevach, 2002; Thornton y Shevach, 1998).

La investigación sobre las bases genéticas causantes del síndrome IPEX (del inglés; *Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked*) en humanos, permitieron el descubrimiento del gen *FOXP3* (del inglés; *Forkhead Box P3*). Este gen codifica para el factor de transcripción Foxp3, cuya deficiencia causa la ausencia de Tregs en estos pacientes, llevando al desarrollo de múltiples desórdenes autoinmunes (Bennett et al., 2001; Chatila et al., 2000; Josefowicz y Rudensky, 2009). El desarrollo posterior de los ratones “scurfy”, deficientes en *Foxp3*, confirmó que la ausencia de Tregs es la causante de las enfermedades autoinmunes que desarrollan estos animales (Brunkow et al., 2001). Foxp3 pasó a convertirse en un marcador específico de células Treg tras demostrarse que su expresión se restringe a este linaje y es necesaria para permitir su diferenciación (Fontenot et al. 2003, 2005b y 2005c; Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003). De hecho, se sabe que las células Treg deben mantener una expresión alta de Foxp3 para poder retener sus propiedades proliferativas, metabólicas y funcionales (Gavin et al., 2007; Lin et al., 2007; Wan y Flavell, 2007). Más recientemente, se han descrito moléculas co-estimuladoras de las células Treg, como CTLA-4 y GITR que, aunque no son exclusivas de estas células, participan en su función supresora (Egen et al., 2002; Esparza y Arch, 2006; Sansom y Walker, 2006). No obstante, Foxp3 sigue considerándose actualmente el marcador por excelencia de las Tregs.

Una de las características de las células Treg es su capacidad proliferativa. Estas células se comportan como células anérgicas en ausencia de estímulos, pero son capaces de proliferar activamente en respuesta a IL-2 cuando son activadas a través de su TCR. Una vez estimuladas, las Tregs pueden inhibir la activación y proliferación de células T efectoras policlonales, frenando así respuestas inmunitarias indeseadas (Shevach et al., 2001).

Por tanto, las células Treg constituyen un subtipo de células T CD4⁺ diferente al de los linfocitos T CD4⁺ convencionales, con capacidad de mantener la tolerancia a antígenos propios y controlar las respuestas autoinmunes evitando así la autoagresión al organismo.

2.2. Subtipos de células Treg.

Las células Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ pueden ser clasificadas en dos subtipos teniendo en cuenta su origen. Hay células Treg que se generan y adquieren su función reguladora en el timo y migran a la sangre como tales. Estas células se denominan células Treg naturales (nTreg). Existe además un subtipo de células Treg que se originan en la periferia a partir de linfocitos T CD4⁺ vírgenes convencionales y que se conocen como células Treg inducidas (iTreg) (Figura 2) (revisado por Curotto de Lafaille y Lafaille, 2009).

2.2.1. Células nTreg.

La mayor parte de las células Treg del organismo adquieren su función en el timo y constituyen la población de nTregs. Numerosos estudios han demostrado que los precursores intratímicos de las nTregs requieren una interacción de alta afinidad de sus TCRs con complejos MHC-II y Ags propios para poder iniciar el proceso de diferenciación hacia ese linaje (Apostolou et al., 2002; Fontenot et al., 2005b; Jordan et al., 2001; Larkin et al., 2008; Modigliani et al., 1991). Estos hallazgos han llevado a proponer que las nTregs podrían generarse a partir de timocitos autorreactivos que escaparían a la selección negativa. Apoyando esta teoría, se ha demostrado que el repertorio de TCRs de las células Treg solapa parcialmente con el de las células autorreactivas (Hsieh et al., 2004 y 2006; Pacholczyk y Kern, 2006 y 2008).

Sin embargo, la activación del TCR no es suficiente para inducir el proceso de diferenciación de las células nTregs, sino que se requieren señales accesorias. La co-estimulación a través del co-receptor CD28 es necesaria para activar correctamente el programa de diferenciación de las nTregs (Figura 3) y los defectos en dicho co-receptor o en sus ligandos tienen como consecuencia una reducción importante en la generación de estos linfocitos en el timo (Salomon et al., 2000; Tai et al., 2005). Por otro lado, la IL-2 también es fundamental en la generación de las nTregs (Figura 3). La deficiencia de CD25 o de la cadena γ del IL-2R (CD132) conlleva un bloqueo en la generación de nTregs en el timo (Fontenot et al., 2005a). Sin embargo, la deficiencia en los receptores de IL-7 (IL-7R) e IL-

15 (IL-15R), que comparten CD132 como cadena común, no parece tener un efecto tan significativo en la generación de nTregs (Vang et al., 2008). De hecho, se ha descrito que las Tregs disminuyen la expresión de la cadena α del IL-7R (CD127) (Seddiki et al., 2006). Por tanto, existe una dependencia directa de la IL-2 para la generación de nTregs en el timo.

La identidad de los progenitores de las nTregs aún sigue siendo objeto de intenso debate (Figura 3). Mientras que algunos estudios han propuesto a la población de timocitos CD4SP como la fuente fisiológica de nTregs (Lio et al., 2008; Watanabe et al., 2005), otros estudios en ratón han sugerido que el compromiso al linaje nTreg se produce en el estadio de timocitos DP (Cabarrocas et al., 2006). De hecho, en humanos se ha identificado una población de timocitos DP Foxp3⁺. Sin embargo, estos timocitos tienen características de células inmaduras incapaces de diferenciarse en células Tregs *in vitro* (Tuovinen et al., 2008). Por último, en el modelo de ratón se ha descrito la regulación en *trans* de una población de timocitos DN capaces de instruir a precursores DP TCR $\alpha\beta$ ⁻ a iniciar su diferenciación al linaje de nTregs (Pennington et al., 2006).

La complejidad del programa de diferenciación de las nTregs se ha puesto de manifiesto al observarse que el incremento de péptidos agonistas no conlleva un aumento en la generación de nTregs en el timo, lo que sugiere que el programa de diferenciación de estos linfocitos depende de la existencia de un nicho intratímico limitante (Bautista et al., 2009; van Santen et al., 2004). En este sentido, aunque se ha propuesto que las TECs (Aschenbrenner et al., 2007; Bensinger et al., 2001) y DCs intratímicas (Proietto et al., 2008, Watanabe et al., 2005) participan en la instrucción funcional de las nTregs (Figura3), todavía no se ha determinado con exactitud cuál es la contribución de las poblaciones de APCs intratímicas a su generación (Figura 3) (Wirnsberger et al., 2009). Por tanto, identificar las bases celulares del programa madurativo de las células nTreg es en la actualidad un objetivo crucial.

2.2.2. Células iTreg.

Durante la última década, se descubrió que los linfocitos T CD4⁺ vírgenes pueden adquirir la expresión de Foxp3 junto con CD25 y ejercer propiedades inmunosupresoras (Apostolou y von Boehmer, 2004; Curotto de Lafaille et al., 2004.). Estas células iTreg se producen en la periferia como respuesta adaptativa a diversas situaciones. Entre ellas, destacan la inducción de tolerancia a Ags de la ingesta en el intestino (Coombes et al., 2007;

Sun et al., 2007) y en la cavidad oral (Mucida et al., 2005), o durante procesos de inflamación crónica (Curotto de Lafaille et al., 2008). Sin embargo, también se ha observado que las iTregs pueden generarse en situaciones patológicas como el cáncer (Liu et al., 2007) o tras el trasplante de tejidos (Cobbold et al., 2004). En este caso, la aparición de iTregs ocasiona trastornos de la respuesta inmunitaria que, dependiendo de la situación, tienen un efecto beneficioso o nocivo.

Las iTregs poseen características propias que las diferencian de las nTregs. En primer lugar, su repertorio de TCRs es idéntico al de los linfocitos T CD4⁺ convencionales, a diferencia de las nTregs (Hsieh et al., 2004 y 2006; Pacholczyk et al., 2006; Wong et al., 2007). En segundo lugar, los mecanismos responsables de la generación de iTregs difieren de los descritos para nTregs. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los linfocitos T CD4⁺ vírgenes requieren TGF- β (Chen et al., 2003) e IL-2 (Horwitz et al., 2003) para diferenciarse en iTregs (Figura 3). Además, la señalización a través de CTLA-4 está implicada en su generación (Figura 3), aunque en el timo, la deficiencia de esta molécula no afecta a la generación de nTregs (Zheng et al., 2006). A diferencia de las nTregs, la estimulación a través de CD28 en linfocitos T CD4⁺ vírgenes es capaz de inhibir la inducción de iTregs mediada por TGF- β *in vitro* (Benson et al., 2007). Finalmente, las iTregs inducidas en mucosas, se generan por un mecanismo que implica al ácido retinoico producido por las DCs residentes (Coombes et al., 2007; Sun et al., 2007).

En resumen, tanto el linaje como los mecanismos implicados en la generación de iTregs y nTregs son diferentes y aún bastante desconocidos (Figura 3). Considerando la relevancia fisiopatológica de las nTregs, en este estudio hemos intentado establecer y caracterizar el origen y los mecanismos de diferenciación de la población de nTregs generadas en el timo humano.

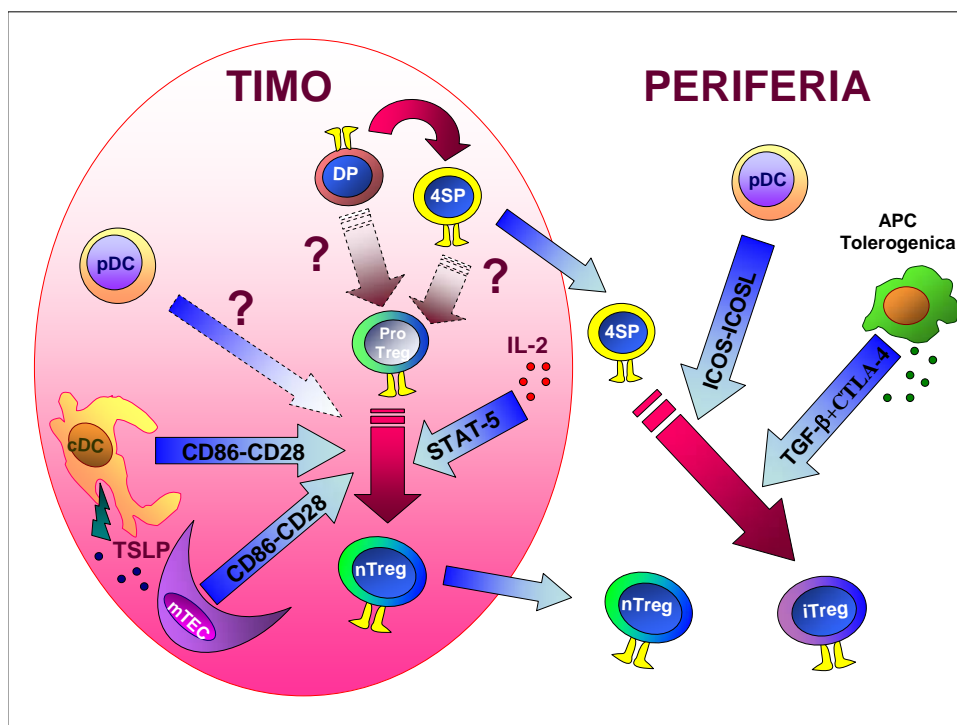


Figura 3. Mecanismos implicados en la generación de nTregs e iTregs.

3. Células dendríticas.

3.1. Función y subtipos de DCs.

Las DCs constituyen un linaje de células hematopoyéticas cuya función más prominente es la captura, procesamiento y presentación de Ags, por lo que se consideran APCs profesionales. Estas células son esenciales para activar a los linfocitos T que inician la respuesta Ag-específica. Al mismo tiempo, las DCs favorecen el desarrollo de procesos inflamatorios mediante el reconocimiento a través de PPRs. Por tanto, las DCs representan un linaje celular clave en la conexión de la inmunidad innata y adaptativa (Banchereau et al., 2000; Steinman, 1991).

Por otro lado, las DCs participan en el desarrollo de la tolerancia inmunológica mediante la eliminación de timocitos autorreactivos en el timo o la inducción de anergia en células efectoras periféricas. Más recientemente, se ha descrito que las DCs pueden inducir también tolerancia periférica promoviendo la generación de células iTregs (Figura 3) (Banchereau y Steinman, 1998; Coombes et al., 2007; Steinman et al., 2003).

Tanto en humanos como en ratón, existen varias subpoblaciones de DCs especializadas en diferentes funciones, que difieren en su fenotipo (Shortman y Liu, 2002). En general, todas las DCs pueden ser calalogadas en dos grandes subtipos denominados DCs convencionales (cDCs) y DCs plasmacitoides (pDCs). Las cDCs se clasifican en diferentes subclases dependiendo de su localización. Las DCs de Langerhan y las DCs dermales habitan en la piel, mientras que existen poblaciones de cDCs asociadas a mucosas o a órganos linfoides como el bazo, los nódulos linfáticos y el timo (Varol et al., 2009; Wu y Liu, 2007). También se ha descrito que los Mos humanos pueden diferenciarse y generar cDCs *in vitro* (Geissman et al., 1998). Posteriormente, se confirmó esta capacidad de los Mos en modelos *in vivo* de ratón (Domínguez y Ardavín, 2010; León et al., 2004 y 2007; Naik et al., 2006; Randolph et al., 1999). Las pDCs, por su parte, constituyen un único subtipo de DCs que inicialmente fue caracterizado por su capacidad de producir grandes cantidades de IFN de tipo I en respuesta a virus (Cella et al., 2000; Martín et al., 2002; Siegal et al., 1999). Estas células se encuentran en la MO y la sangre, pero están especialmente enriquecidas en órganos linfoides primarios como el timo y las amígdalas.

En humanos, las cDCs se caracterizan por expresar moléculas mieloides como CD11c y CD13, mientras que las pDCs carecen de marcadores mieloides pero muestran específicamente niveles altos de expresión de la cadena α del IL-3R (CD123) y de las lectinas de tipo C BDCA-2 y BDCA-4 (Dzionek A et al., 2000; Robinson et al., 1999; Shortman y Liu, 2002). Por otro lado, se ha descrito la expresión de marcadores linfoides como CD7 en las pDCs intratímicas humanas (Bendriiss-Vermare et al., 2001; de Yébenes, et al., 2002). Además, ambos tipos de DCs difieren en su expresión de varios miembros de la familia de los receptores TLR (del inglés, *Toll-Like Receptor*), siendo TLR-4 y -2 específicos de cDCs y TLR-7 y -9 de pDCs. Este patrón diferencial de PPRs determina pues su capacidad de respuesta a diferentes patógenos (Liu, 2005).

3.2. DCs intratímicas.

En el timo residen ambas poblaciones de cDCs y pDCs (Bendriiss-Vermare et al., 2001; Okada et al., 2003; Vandenabeele S 2001), siendo la función más establecida de las DCs intratímicas la inducción de selección negativa y la generación de tolerancia central (Brocker et al., 1997; Nossal, 1994; Van Meerwijk et al., 1997). Estudios recientes en humanos indican que las cDCs intratímicas son también capaces inducir la generación de

nTregs *in vitro* (Watanabe et al., 2005) a partir de timocitos CD4SP alogénicos, en respuesta a TSLP (del inglés; *Thymic Stromal Lymphopoietin*), una citoquina producida por las células epiteliales de los corpúsculos de Hassal intratímicos (He y Geha, 2010; Sims et al., 2000) (Figura 3). Más recientemente, también se ha identificado en ratón una subpoblación de cDCs SIRP α^+ que migra específicamente al timo (Li et al., 2009) donde presenta Ags de tejidos periféricos a los timocitos en desarrollo e induce la generación de células Treg (Proietto et al., 2008).

Sin embargo, el conocimiento de la función de las pDCs intratímicas es todavía muy limitado. Mientras que existen evidencias de la capacidad de las pDCs de inducir la generación de iTregs en periferia en humanos y ratón (Figura 3) (Gilliet y Liu, 2002; Goubier et al., 2008; Ochando et al., 2006), no está claro si las pDCs del timo de ratón pueden comportarse como DCs tolerogénicas (Proietto et al., 2008). Por su parte, la función de las pDCs residentes en el timo humano no había sido analizada hasta el inicio de este estudio, por lo que éste ha sido uno de nuestros objetivos.

3.3. Linaje de las DCs.

Aunque el origen mieloide de las DCs periféricas, en concreto de las cDCs, es un tema aceptado (Young y Steinman, 1996), la identidad de los progenitores de las diferentes poblaciones de DCs presentes en el timo ha sido objeto de controversia durante años. El inicio de este debate se remonta al hallazgo en ratón de que los progenitores que colonizan el timo no están restringidos al linaje T sino que son capaces de generar DCs (Ardavin C et al., 1993), además de otros tipos de linfocitos como las células NK (Shortman y Wu, 1996). La idea prevalente entonces de que el timo se colonizaba por progenitores restringidos al linaje linfoide (CLP; del inglés, *Common Lymphoid Progenitor*) estableció el concepto de que, al menos las DCs intratímicas, tenían un origen linfoide (Shortman et al., 1997). Sin embargo, estudios de nuestro laboratorio en humanos (de Yébenes et al., 2002; Márquez et al., 1995 y 1998), posteriormente corroborados en ratón (Bell y Bhandoola; 2008; Wada et al., 2008), indicaron que los progenitores intratímicos más tempranos poseen potencial mieloide y son capaces de generar Mos e incluso granulocitos. Por tanto, los progenitores procedentes de la MO que colonizan el timo son precursores multipotenciales con capacidad linfo-mieloide, por lo que se denominaron TLMPs (del inglés *Thymic Lympho-Myeloid Progenitors*). Diversos estudios de nuestro laboratorio (de Yébenes et al., 2002; García-Peydró et al., 2006)

confirmaron esta nueva idea y corroboraron el origen mieloide de las DCs intratímicas. En efecto, nuestros experimentos mostraron que el desarrollo de estas DCs ocurre a través de un progenitor intermediario restringido al linaje mieloide presente en el timo humano. Varios estudios, además, reportaron que las DCs generadas a partir de este precursor presentaban un fenotipo mieloide idéntico a las cDCs identificadas *in vivo* en el timo y la periferia (Banchereau et al., 2000; de Yébenes et al., 2002; Vandenabeele et al., 2001). Sin embargo, no se estableció la capacidad de este precursor mieloide intratímico para generar pDCs, ni el origen de este subtipo de DCs.

Las pDCs, tanto intratímicas como periféricas expresan diversos genes linfoides, tales como la cadena pT α del pre-TCR (Res et al., 1999) e incluso presentan reordenamientos D-J de la cadena IgH (Corcoran et al., 2003; Shigematsu et al., 2004), lo que sugiere su origen linfoide. Confirmando esta posibilidad, se ha identificado un subtipo de pDCs en la MO de ratón que expresa los genes linfoides *Rag-1* y *Pax5* (Pelayo et al., 2005). En conjunto, estos datos podrían sugerir que los dos subtipos de DCs, cDCs y pDCs, representarían DCs mieloides y linfoides, respectivamente, que se generarían a través de progenitores hematopoyéticos independientes. De hecho, se ha propuesto que las DCs linfoides y mieloides se diferencian siguiendo programas madurativos distintos (Guerriero et al., 2000).

Sin embargo, diversos estudios han demostrado que, por debajo del progenitor multipotencial de la MO o HSC, tanto el progenitor CLP, como el precursor común mieloide (CMP; del inglés, *Common Myeloid Progenitor*), son capaces de generar todos los tipos descritos de DCs en el ratón (Karsunky et al., 2003; Manz et al. 2001a y 2001b; Traver et al., 2000; Wu et al., 2001) y pDCs y cDCs en humanos (Ishikawa et al., 2007; Chicha et al., 2004) (Figura 4). Estos trabajos indicaban una plasticidad única del linaje de DCs y sugerían un origen común de ambos tipos de DCs, al menos en la periferia. Confirmando esta posibilidad, del Hoyo y colaboradores caracterizaron una población de precursores con potencial de generación de pDCs y cDCs presente en la sangre de ratón (del Hoyo et al., 2002). No obstante, actualmente, se cuestiona la existencia del CLP en la MO y el timo y se propone la relevancia funcional de una población alternativa de progenitores linfoides denominados LMPPs (del inglés, *Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor*) que habrían perdido el potencial megacariocítico-eritroide pero retendrían potencial mieloide (Adolfsson et al., 2005). Esta población se caracteriza por la expresión del receptor FLT3 (del inglés; *Fms-Like Tyrosine kinase 3*) (Figura 4).

Se ha descrito que ambos tipos de DCs, pDCs y cDCs, se generan a partir de una población de precursores que expresan el receptor FLT3 (Karsunky et al., 2003; Mende I et al., 2006). La señalización vía FLT3 parece ser clave en la generación de DCs *in vivo*. Se ha observado que la administración de su ligando (FLT3L) a ratones reconstituidos con CMPs o CLPs incrementa sensiblemente la generación de DCs (Maraskovsky et al., 1996). En el transcurso de nuestro estudio, resultados publicados por los grupos de Markus Manz y Ken Shortman demostraron a nivel clonal la existencia de una población de progenitores mieloides FLT3⁺ en la MO de ratón capaz de generar pDCs y cDCs (Figura 4) (Naik et al., 2007; Onai et al., 2007). No obstante, no se ha descrito hasta la fecha la existencia de progenitores equivalentes capaces de generar ambas poblaciones de DCs en órganos linfoides como el timo. Por tanto, este objetivo constituye uno de los aspectos analizados en nuestro estudio.

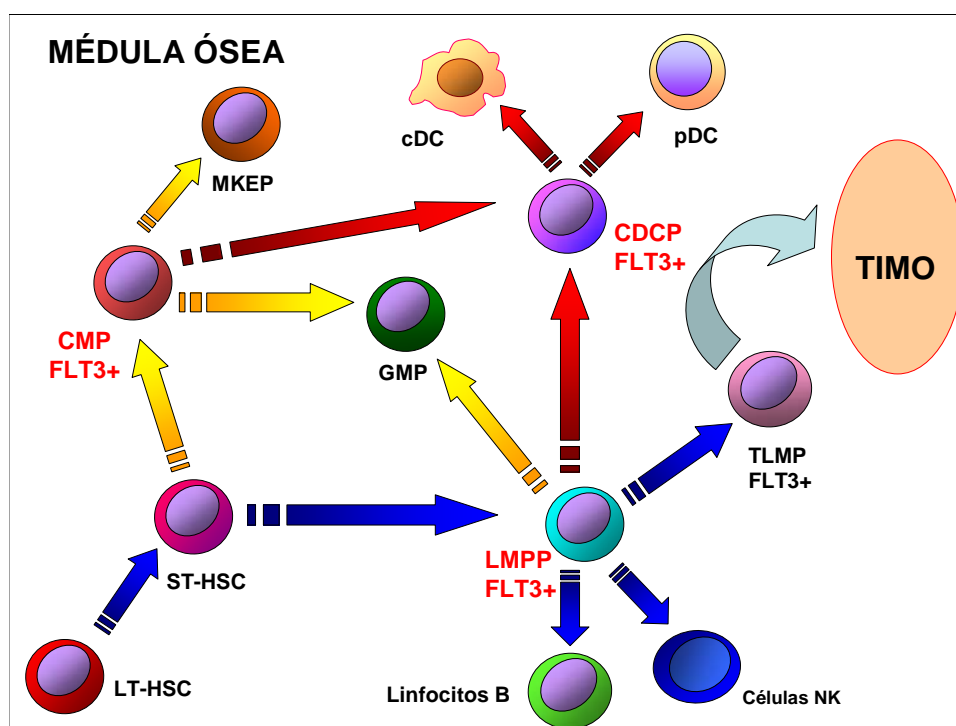


Figura 4. Esquema de la ontogenia de las DCs residentes en la MO. LT-HSC (célula madre hematopoyética con capacidad de reconstitución a largo plazo); ST-HSC (célula madre hematopoyética con capacidad de reconstitución a corto plazo); CMP (progenitor común mieloide); MKEP (progenitor del linaje megacariocítico-eritroide); GMP (progenitor de granulocitos y monocitos); CDMP (progenitor común de DCs); LMPP (Progenitor linfóide con capacidad multipotencial); TLMP (progenitor intratímico con potencial linfo-mieloide). En rojo se han resaltado las rutas madurativas que conducen a la generación de DCs y en amarillo las que dan lugar a progenitores o células mieloides.

3.3.1. Origen de las DCs intratímicas humanas.

Nuestro grupo describió hace años que los progenitores TLMPs humanos poseen la capacidad de diferenciarse en dos poblaciones independientes de precursores intermediarios, de linaje linfoide o mieloide, que difieren en la expresión de CD44 y expresan selectivamente receptores para la citoquina linfoide IL-7 (CD127) o el factor de crecimiento mieloide GM-CSF (CD116), respectivamente. Estos estudios demostraron que los precursores linfoides $CD44^{lo} CD127^{+}$ contienen potencial de generación T y NK, mientras que la población mieloide $CD44^{hi} CD116^{+}$ es capaz de generar Mos, cDCs y también células NK (de Yébenes et al., 2002; Márquez et al., 1995 y 1998) (Figura 5). Sin embargo, el origen de las pDCs intratímicas humanas no se estableció en estos estudios.

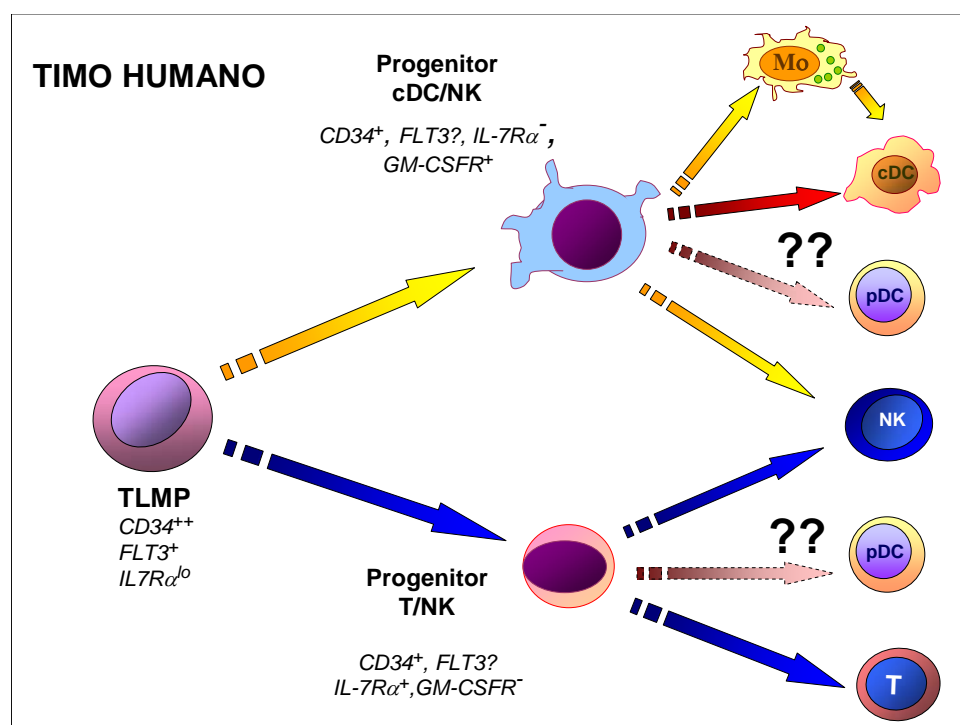


Figura5. Modelo de desarrollo de las poblaciones T y no-T presentes en el timo humano. Las flechas rojas señalan la diferenciación de DCs, mientras que las amarillas destacan la generación de células o progenitores no-T.

Aunque en ratón se han identificado pDCs intratímicas que colonizan el timo desde la periferia (Li J, et al., 2009), la observación en humanos de que las pDCs pueden ser generadas *in vitro* a partir de TLMPs (Fohrer et al., 2004) sugería la generación *in situ* de pDCs en el timo. Confirmando esta posibilidad, estudios realizados en modelos animales

transplantados con tejido de timo humano demostraron que los progenitores hematopoyéticos humanos CD34⁺ pueden migrar al timo transplantado y dar lugar a pDCs (Weijer et al., 2002). Las pDCs intratímicas humanas, a diferencia de sus homólogos periféricos, expresan el marcador linfoide CD7 (de Yébenes et al., 2002; Strobl et al., 1998), que se adquiere muy tempranamente en TLMPs tras su llegada al timo (Hao et al., 2008). Estas pDCs poseen además un perfil de expresión génica que incluye genes linfoides (Fohrer et al., 2004; Res et al., 1999; Shigematsu et al., 2004). Estos datos apoyan el origen linfoide de las pDCs y sugieren la posibilidad de que estas células se generen en el timo humano a partir de progenitores intermediarios linfoides CD7⁺ T/NK (Figura 5). Por tanto, es necesario establecer si el potencial pDC contenido en la población de TLMPs humanos reside en la población de precursores intermediarios mieloides o linfoides, por lo que éste ha sido otro de los objetivos de nuestro trabajo.

3.3.2. Factores reguladores de la diferenciación del linaje de pDCs.

Durante más de una década se ha investigado intensamente con el objetivo de identificar las señales específicas que inducen el proceso de diferenciación de las pDCs a partir de los progenitores hematopoyéticos multipotenciales (revisado por Reizis, 2010). Estudios pioneros del grupo de Hergen Spits (Spits et al., 2000) demostraron que las proteínas Id2 e Id3, miembros de la familia Id de represores transcripcionales de los factores de transcripción bHLH (del inglés, *Basic Helix-Loop-Helix*) (proteínas E), inhibían la diferenciación de pDCs a partir de progenitores hematopoyéticos humanos CD34⁺ CD38⁻, sin afectar la generación de otros linajes como cDCs y NKs (Figura 6). Posteriormente a la identificación de estos reguladores negativos, el mismo grupo (Schotte et al., 2004) identificó un inductor del desarrollo de las pDCs humanas, el factor SpiB, miembro de la familia de factores de transcripción ETS. Aunque se sabía que SpiB se expresa en células B y está implicado en la formación de centros germinales (Su et al., 1997), este grupo demostró que SpiB se expresa de forma prominente en pDCs humanas (Schotte et al., 2003), donde parece ser esencial para su desarrollo *in vitro* e *in vivo* a partir de HSCs (Schotte et al., 2004). Por el contrario, ratones deficientes en SpiB presentan una proporción normal de pDCs en el bazo (Reizis, 2010), lo que sugiere diferencias entre especies probablemente debidas a redundancia funcional con factores relacionados.

El balance de proteínas Id y proteínas E regula estrechamente la diferenciación de las células hematopoyéticas (Cochrane et al., 2009; Kee, 2009). El descubrimiento del papel inhibitorio de Id2 e Id3 en la generación de pDCs sugirió la implicación de una proteína E en el proceso. En efecto, estudios recientes han demostrado que la proteína E2-2 se expresa a niveles elevados en pDCs, pero no en cDCs humanas. E2-2 participa en el desarrollo de linfocitos T (Bergqvist et al., 2000) y su función es asimismo necesaria para la generación de pDCs humanas (Nagasawa et al., 2008). Además, E2-2, a diferencia de SpiB, es capaz de revertir el efecto inhibitorio de Id2 en el desarrollo de pDCs. Aunque ambas proteínas, E2-2 y SpiB, favorecen la generación de pDCs a partir de TLMPs cuando se sobre-expresan, la función de E2-2 es dependiente de la presencia de SpiB, lo que sugiere la conexión entre ambos factores durante el proceso de diferenciación de las pDCs (Nagasawa et al., 2008; Reizis, 2010).

Otro factor de transcripción implicado en la generación de pDCs, pero no de cDCs en ratón, es Ikaros (Allman et al., 2006). Ikaros pertenece a una familia de factores de transcripción con dominios “zinc finger” en la que se incluyen otros miembros: Helios y Aiolos. Inicialmente se pensó que estas proteínas regulaban selectivamente el desarrollo linfóide T y B (Schmitt et al., 2002a). Sin embargo, los ratones que expresan formas mutadas de *Ikaros* carecen de DCs en los órganos linfoides (Wu et al., 1997). En humanos, la falta de función de Ikaros bloquea la generación de cDCs a partir de CLPs de MO *in vitro* (Figura 6) (Galy et al., 2000). Por tanto, la implicación de los miembros de la familia Ikaros en el desarrollo de las DCs ha de ser investigada con más detenimiento. En conjunto, estos estudios ponen de manifiesto la compleja red de interacciones moleculares que subyace al desarrollo de las pDCs (Figura 6).

Además de los factores de transcripción, los receptores para factores de crecimiento son elementos claves en la señalización durante el desarrollo de las células hematopoyéticas. El hallazgo de que los progenitores de las pDCs expresan el receptor FLT3 condujo al estudio de las posibles señales, derivadas de este receptor, que pudieran regular la diferenciación de las pDCs. FLT3 activa a la proteína STAT-3 (Onai et al., 2006) en modelos de diferenciación *in vitro* de pDCs, aunque la deficiencia de STAT-3 afecta a la generación, no sólo de pDCs, sino también de cDCs, lo que sugiere una función general en la diferenciación de las DCs (Laouar et al., 2003). La señalización por FLT3 induce la expresión del factor de transcripción *Irf-8* (del inglés; *Interferon Regulatory Factor 8*),

The diagram illustrates the signaling pathways for cDC and pDC differentiation. GM-CSF-R and FLT3 receptors activate STAT-5 and STAT-3, respectively. STAT-5 promotes IRF-4, while STAT-3 inhibits IRF-8. IRF-8 promotes Id2 and inhibits Spi B. Id2 promotes PU.1, which in turn promotes cDC. Spi B promotes E2-2, which promotes Ikaros (Ratón), which promotes pDC. There are also unknown interactions (??) between IRF-8 and the pDC lineage.

Figura 6. Factores implicados en la regulación de la diferenciación de pDCs.

4. Receptores Notch.

4.1. Receptores Notch y ligandos.

Los receptores Notch pertenecen a una familia de receptores de membrana de tipo I muy conservados durante la evolución. Se han descrito cuatro miembros en vertebrados (Notch 1, 2, 3 y 4) (Figura 7) que se activan tras la interacción con ligandos específicos expresados en células adyacentes. Tras esta interacción, los receptores sufren diversos cortes proteolíticos por metaloproteasas y γ secretasas, liberando el dominio intracelular, que constituye la forma activa capaz de migrar al núcleo. Allí se une a coactivadores de la familia MAML (del inglés, *Mastermind-like*), desplazando represores y activando la expresión de diferentes genes, entre los que destaca el inhibidor transcripcional HES 1, a través del factor de transcripción CSL (CBF1/ RBPJk en mamíferos, *Su(H)* en *Drosophila* y *LAG-1* en *C. elegans*) (Gordon et al., 2008; Kageyama et al., 2007; Kopan e Ilagan, 2009; Yuan et al., 2010) (Figura 7). Los receptores Notch regulan diversos procesos biológicos durante el desarrollo embrionario y en la vida adulta, tales como la proliferación, supervivencia y diferenciación de progenitores (de la Pompa, 2009; Kageyama et al., 2007; Liu et al., 2010; Scehnet et al., 2007), y han sido implicados en la generación de células tumorales (Koch y Radtke, 2010; Lin et al., 2006; Pear et al., 1996; Weng et al., 2004).

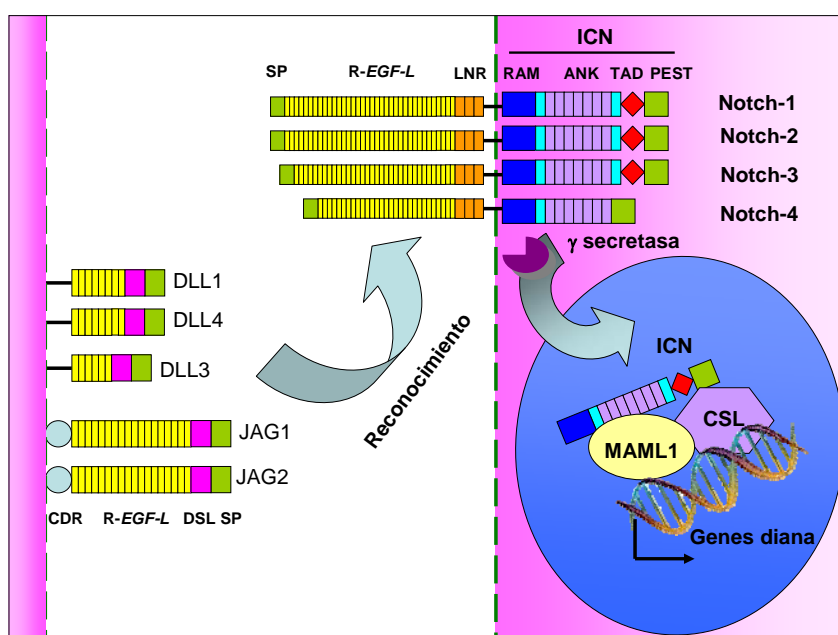


Figura 7. Familia de receptores Notch, ligandos y su vía de señalización. ANK (Repeticiones anquirina), CDR (Dominio rico en cisteínas), DSL (Dominio “Delta Serrate LAG-2”), ICN (Porción intracelular del receptor Notch), LNR (Repeticiones “Lin-Notch”), PEST (dominio PEST, implicado en la degradación), R-EGF-L (Repeticiones de tipo EGF), SP (Péptido señal), TAD (Dominio de transactivación).

Los ligandos canónicos de Notch incluyen 3 miembros de la familia *Delta-like* (DLL1, DLL3 y DLL4) y 2 miembros de la familia *Jagged* (JAG1 y JAG2) (D'Souza et al., 2008 y 2010) (Figura 7). Estudios realizados durante los últimos años han sugerido que distintos receptores Notch podrían reconocer diferentes ligandos con distinta afinidad (Shawber et al., 2003; Shimizu et al., 2000a y 2000b; Uyttendaele et al., 2000) (Tabla3). El diálogo entre los receptores Notch y sus ligandos ha sido estudiado ampliamente en hematopoyesis. A continuación, pasaremos a analizar los aspectos más destacables del conocimiento actual en ese campo.

	Notch 1	Notch 2	Notch 3	Notch 4
DLL1	+++	+++	+++	+(?)
DLL4	++++	nd	nd	+(?)
JAG1	+	+(?)	+	+(?)
JAG2	++	+(?)	++	nd

Tabla1. Resumen de las interacciones de receptores Notch con sus ligandos canónicos. +, afinidad baja; ++, afinidad media; +++, afinidad alta; +++++, afinidad muy alta; +(?), interacción con afinidad desconocida; nd, no descrito.

4.2. Notch en hematopoyesis.

La activación de la vía de Notch es esencial para la generación de las HSCs durante el desarrollo embrionario (Bigas et al., 2010; Kumano et al., 2003), aunque su implicación en el mantenimiento y autorenovación de las HSCs postnatales es más controvertida (Maillard et al., 2008). En el adulto, Notch participa en la generación, proliferación y/o diferenciación de diversos tipos hematopoyéticos (Karanu et al., 2003; Kunisato et al., 2003; Shojaei et al., 2005; Vercauteren y Sutherland, 2004). Entre ellos, el linfocito T constituye el prototipo celular cuya generación es estrictamente dependiente de la señalización por Notch. Experimentos de pérdida de función demostraron que la activación a través del receptor Notch 1 es capaz de instruir a los progenitores que llegan al timo, inicialmente identificados como progenitores linfoides CLP, induciendo el programa madurativo específico del linaje T a costa de la generación de linfocitos B (Pui et al., 1999; Schmitt y Zúñiga-Pflücker, 2002). Dichas señales inductivas son liberadas tras la interacción específica de Notch 1 con su ligando DLL4 expresado en el epitelio tímico (Koch et al., 2008). Además, Notch regula diversos procesos en etapas tempranas del desarrollo intratímico, tales como la expresión del

IL-7R y, en consecuencia, la expansión de los progenitores pre-T (González-García et al., 2009; Magri et al., 2009), el balance en la generación de linfocitos T $\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$ (García Peydró et al., 2006; Van de Walle et al., 2009) o el proceso de selección β (Ciofani et al., 2004; Taghon et al., 2009).

Tras el hallazgo de que el timo se coloniza por progenitores multipotenciales que mantienen potencial mieloide y NK además de T y B, diversos estudios, incluidos los nuestros, demostraron que una de las funciones más prominentes de Notch en el timo es el bloqueo de la diferenciación celular y la inhibición de la generación de linajes no-T (García-Peydró et al. 2006; Heinzl K et al., 2007), aunque distintos ligandos de Notch podrían regular diferencialmente este proceso (Jaleco et al., 2001; Lehar SM et al., 2005). Sin embargo, aunque en pequeñas proporciones, el timo adulto contiene células no-T, lo que plantea importantes cuestiones acerca de una posible regulación espacio-temporal de la función de Notch en el timo, o de la existencia de funciones ligando-específicas dependientes de nichos particulares que puedan regular la generación de células no-T. Éstas son preguntas que hemos intentado responder en este trabajo en referencia a la generación de DCs intratímicas y que constituyen uno de nuestros objetivos. En este sentido, se ha descrito que Notch participa en la generación de células no-T extratímicas, tales como linfocitos B de la zona marginal de los ganglios linfáticos (Hozumi et al., 2004) y células mieloides (Mercher et al., 2008; Neves et al., 2006), aunque otros autores sugieren que Notch inhibe el desarrollo de progenitores mieloides y de granulocitos (Bigas et al., 1998; de Pooter et al., 2006; Sakata-Yanagimoto et al., 2008; Zhou et al., 2008). Por tanto, la función de Notch en la generación de células mieloides es aún controvertida y merece ser analizada en detalle.

4.2.1. Implicación de Notch en el desarrollo de DCs.

Varios estudios han sugerido la participación de la ruta de Notch en la generación *in vitro* de DCs, aunque esta función sigue siendo objeto de debate. Mientras que algunos trabajos sugieren que la activación de Notch favorece o permite el desarrollo de cDCs periféricas (Caton et al., 2007; Cheng et al., 2003 y 2007; Ohishi et al., 2001), otros autores defienden que Notch inhibe su generación (García-Peydró et al., 2006). En el timo, la activación de Notch también parece inhibir la generación de cDCs a partir TLMPs humanos (García-Peydró et al., 2006). El diferente origen de los progenitores analizados y las diferentes citoquinas utilizadas en estos estudios podrían explicar estos resultados

contradictorios. La influencia de Notch en la diferenciación de las pDCs es también controvertida. Aunque se ha demostrado que DLL1 favorece la generación de pDCs a partir de progenitores de MO (Olivier A et al., 2006), el mismo ligando parece tener el efecto opuesto en TLMPs, mientras que JAG1 permite su generación (Dontje et al., 2006).

A pesar de que aún no se ha descrito la distribución de los ligandos de Notch en el timo humano, estudios en ratón han demostrado que en la médula tímica se expresa preferentemente JAG1, mientras que en la corteza el ligando mayoritario es DLL1 (Lehar et al., 2005). Teniendo en cuenta que las DCs intratímicas humanas se localizan en la médula (Bendriss-Vermare et al., 2002; Wu y Shortman, 2005), existe la posibilidad de que su generación se produzca a partir de TLMPs en respuesta a ligandos específicos, distintos de los que participan en la generación del linaje T en la corteza.

En este escenario, el estudio de la implicación de Notch y sus diferentes ligandos en la generación de las DCs intratímicas humanas parece un tema prioritario y ha constituido uno de los objetivos de este estudio.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo central de este trabajo ha sido el estudio del origen, el desarrollo intratímico y la posible función tolerogénica de las pDCs residentes en el timo humano, haciendo especial énfasis en los mecanismos que determinan la generación de las células nTreg humanas. Los objetivos concretos han sido:

- 1. Estudio de la contribución de las pDCs residentes en el timo humano a la generación de células nTreg.**
- 2. Identificación de los progenitores fisiológicos de las nTregs y de los mecanismos que regulan su diferenciación en el timo humano.**
- 3. Identificación de nuevos candidatos posibles reguladores del programa madurativo de las pDCs humanas.**
- 4. Estudio de la función de Notch en el desarrollo de las DCs intratímicas. Efecto de los diferentes ligandos de Notch.**

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de poblaciones celulares

1.1. Aislamiento de poblaciones de timo postnatal humano.

Las poblaciones de timocitos humanos postnatales se obtuvieron a partir de fragmentos de timo recogidos en operaciones cardíacas correctivas de pacientes de edad comprendida entre un mes y seis años de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Tras la homogeneización mecánica del tejido tímico, las suspensiones de timocitos se sometieron a centrifugación en Ficoll Hypaque utilizando *Lymphoprep*TM, *ATOM*. Las fracciones celulares obtenidas en la interfase (timocitos totales) fueron sometidas a selección inmunomagnética manual (*Dynal*) o automática (*AutoMACs*, *Miltenyi Biotec*) o a purificación por citometría de flujo preparativa (FACS; del inglés, *Fluorescence Activated Cell Sorting*) con el objetivo de aislar las siguientes poblaciones:

1.1.1. Progenitores multipotenciales TLMPs $CD34^{hi} CD1a^{-}$.

Los timocitos totales se incubaron con eritrocitos de carnero durante 45 minutos a 4°C y posteriormente se sometieron a centrifugación en Ficoll-Hypaque con el fin de eliminar células $CD2^{+}$ y enriquecer en células $CD2^{lo/-}$, que incluyen progenitores $CD34^{+}$ y células no-T (Márquez et al., 1998). La población obtenida se incubó con bolas magnéticas cubiertas de anticuerpos monoclonales anti- $CD34$ (*DynaBeads M450 CD34*, *Dynal CD34 Progenitor Cell selection System*, *Invitrogen*) durante 30 min a 4°C, permitiendo la separación de células $CD34^{+}$. Además, se purificaron poblaciones de progenitores $CD34^{+lo}$ y $CD34^{hi}$ de la fracción de células $CD34^{+}$ tras dos incubaciones consecutivas de 30 minutos con un anticuerpo anti- $CD34$ competidor (*DETACHaBEAD*, *Dynal CD34 Progenitor Cell selection System*, *invitrogen*) a 25°C y 37°C, respectivamente. Finalmente, se aisló la población de progenitores intratímicos TLMPs tras la eliminación de células $CD1a^{+}$ de la fracción $CD34^{hi}$ mediante bolas magnéticas *anti-CD1a Microbeads* (*Miltenyi Biotec*).

1.1.2. Células dendríticas plasmacitoides y convencionales.

Se obtuvieron fracciones de timocitos enriquecidas en células no-T como se ha descrito en el apartado 1.1.1, que se incubaron con bolas magnéticas anti-CD14 (*CD14Microbeads, Miltenyi Biotec*) y se eliminaron los Mos/MΦs CD14⁺ por selección magnética en AutoMACs. A partir de la fracción CD14⁻ se aislaron células pDCs y cDCs mediante tinción con anticuerpos anti-CD123 o anti-CD13 (*BD Biosciences*), respectivamente, acoplados a ficoeritrina (PE), tratamiento con bolas magnéticas anti-PE (*anti-PE Microbeads, Miltenyi Biotec*) y separación en AutoMACs.

1.1.3. Timocitos CD4SP CD25⁻, DP CD69^{lo} pequeños y DP CD69^{hi} grandes.

Las suspensiones de timo total se centrifugaron en gradientes de densidad de Percoll (*GE Healthcare*) con el objetivo de enriquecer en diferentes poblaciones de timocitos con diferente tamaño. Las fracciones denominadas F50 (densidad 1,068) y F60 (densidad 1,08) estaban enriquecidas en células de tamaño grande y pequeño, respectivamente (Trigueros et al., 1998). Los timocitos CD4SP CD25⁻ se aislaron de la F60 tras la eliminación de células CD8⁺ (*anti-CD8 Multisort beads, Miltenyi Biotec*) y la posterior selección positiva de timocitos CD4⁺ (CD4SP) (*anti-CD4 Multisort beads, Miltenyi Biotec*). La eliminación de células Treg CD25⁺ de la población de timocitos CD4SP se llevó a cabo con anticuerpos anti-CD25-PE (*BD Biosciences*) y bolas magnéticas anti-PE (*Miltenyi Biotec*). Las poblaciones de timocitos DP grandes (L-DP) y pequeños (S-DP) (procedentes de la F50 y la F60, respectivamente) se aislaron por medio de dos protocolos de selección positiva consecutivos utilizando anti-CD4 y anti-CD8 multisort beads (*Miltenyi Biotec*). Para seleccionar células DP CD69^{hi} y CD69^{lo} a partir de la población de L-DP utilizamos anticuerpos anti-CD69-PE (*Caltag*) y bolas anti-PE obteniendo las poblaciones de timocitos DP CD69^{hi} grandes (L-DP CD69^{hi}) y DP CD69^{lo} grandes (L-DP CD69^{lo}).

1.2. Aislamiento de linfocitos T CD4⁺ CD25⁻ de sangre periférica.

Para el aislamiento de linfocitos T CD4⁺ CD25⁻ periféricos, se obtuvieron células mononucleadas de sangre procedentes de donantes sanos por centrifugación en gradiente de Ficoll Hypaque. A continuación, estas células se incubaron con anticuerpos monoclonales conjugados con PE que reconocen CD8, CD15, CD19, CD56 (*Caltag*) y CD13, CD14, CD25, CD33, CD123 (*BD Biosciences*) y se eliminaron las células marcadas tras el

tratamiento con bolas anti-PE. Finalmente se seleccionaron positivamente los linfocitos CD4⁺ con bolas anti-CD4 hasta alcanzar una pureza $\geq 95\%$.

1.3. Aislamiento de poblaciones de progenitores intermediarios CD5^{hi} CD123⁻ y CD5^{lo} CD123⁺ generados in vitro.

Las poblaciones de progenitores intermediarios generadas *in vitro* como se indica en el apartado 3.1, fueron purificadas en base a su expresión diferencial de CD5 y CD123 por FACS. Para ello, las células se incubaron con anticuerpos anti-CD5 y anti-CD123 durante 30 min en solución de separación (PBS; 2mM EDTA; 5% BSA; del inglés, *Bovine Serum Albumin*) a 4°C, se filtraron (70 μ m Cup Filcons, BD Biosciences) y se purificaron en un BD FACSAriaTM Cell sorter (BD Biosciences) en directa colaboración con las Dras. María Luisa Gaspar y Belén de Andrés del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

2. Análisis por citometría de flujo.

2.1. Marcaje de antígenos de membrana.

La determinación de marcadores de superficie en células primarias humanas o cultivadas *in vitro* se realizó por tinción de $1-2 \times 10^5$ células con cantidades saturantes del anticuerpo de ratón correspondiente, bien sin marcar o conjugados a fluorocromos durante 15 min a 4°C en 50 μ l de solución de tinción (PBS; 1% suero bovino fetal; 1% BSA; azida sódica 10mM). En las tinciones indirectas, las células se incubaron posteriormente con anticuerpos anti-inmunoglobulinas (Igs) de ratón conjugados a los fluorocromos FITC, PE o APC (Caltag, Southern Biotech, BD Biosciences). Como control negativo, se utilizaron anticuerpos de ratón irrelevantes del mismo isotipo acoplados directamente a diferentes fluorocromos (Caltag) o anticuerpos isotípicos irrelevantes en combinación con anticuerpos anti-Igs de ratón acoplados a fluorocromos (Caltag). La apoptosis celular se determinó por tinción con Anexina V conjugada a biotina (Roche) y avidina unida a FITC o a APC (BioLegend) siguiendo el protocolo de la casa comercial (BD Biosciences).

2.2. Marcaje de antígenos intracelulares.

Para el estudio de la expresión de proteínas intracelulares, las células marcadas en membrana como hemos descrito se incubaron con una solución de fijación (*Fixation/permeabilization concentrate, eBioscience*) durante 30 min a 4°C. El marcaje intracelular se realizó en las células fijadas en presencia de una solución permeabilizadora (*Permeabilization buffer, eBioscience*) durante 30 minutos a 4°C.

2.3. Citómetro y análisis de datos.

El análisis multiparamétrico de marcadores analizados en poblaciones celulares por citometría de flujo se realizó en un citómetro FACSCalibur (*BD Biosciences*) utilizando protocolos de adquisición de 3 y 4 colores. Los datos obtenidos fueron posteriormente analizados con ayuda de los programas informáticos CellQuest (*BD Biosciences*) y FlowJo (*Tree Star, Inc*).

2.4. Resumen de anticuerpos utilizados para los estudios de citometría de flujo.

El total de anticuerpos frente antígenos humanos utilizados en este estudio se resume en la tabla 2.

Especificidad	Clon	Fuente	Conjugado
CD1a	SFC119Thy1A8	Beckman Coulter	PE
CD3	UCHT1, S4.1	BD Biosciences, Caltag	PE, TC
CD4	13B8.2	Beckman Coulter	FITC, PC5
CD5	L17F12, CD5-5D7, BL1a	BD Biosciences, Caltag Beckman Coulter	FITC, PE, PC5
CD7	CD7-6B7	Caltag	FITC, PE, TC
CD8	G42-8, 3B5	BD Biosciences, Caltag	FITC, PE
CD11b	VIM12	Caltag	FITC
CD11c	BU15	Caltag	FITC

CD13	WM15, Immu103.44	BD, BeckmanCoulter	PE, PC5
CD14	M5E2, MøP9	BD Biosciences	FITC, PE
CD25	M-A251, BC96	BD Biosciences, eBioscience	PE, APC
CD28	9.3	Bristol-Myers	Sin marcar
CD33	P67.6, D3HL60.251	BD Biosciences, Beckman Coulter	PE, PC5
CD34	581	Beckman Coulter	FITC, PC5
CD44	G44-26 (C26)	BD Biosciences	FITC
CD45RA	MEM-56	Caltag	PE
CD45RO	UCHL1	Caltag	PE
CD56	MEM-188, N901(NKH1)	Caltag, Immunotech	PE, PC5
CD69	CH/4	Molecular Probes (Invitrogen)	PE
CD80	L307.4	BD Biosciences	PE-Cy5
CD86	2331(FUN-1)	BD Biosciences	FITC
CD94	HP-3B1	Immunotech	PE
CD116	SCO6	Immunotech	PE
CD122	CF1	Immunotech	PE
CD123	9F5, AC145	BD Biosciences, Miltenyi Biotec	PE, APC
CD127	R34.34	Beckman Coulter	PE
CD135	4G8	BD Biosciences	PE
CD154 (CD40L)	TRAP1	BD Biosciences	APC
CD275 (ICOSL)	MIH12	eBioscience	Biotina
CD303(BDCA2)	AC144	Miltenyi Biotec	FITC

Foxp3	PCH101	eBioscience	PE
HLA DR	TÜ 36	Caltag	FITC, PE
ICOS	C398.4A	Dra. Pilar Portolés	FITC
NKG2A	Z199	Immunotech	Sin marcar
TCR $\alpha\beta$	IP26A	Beckman Coulter	PC5

Tabla 2. Relación de anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

3. Sistemas de cultivo de células primarias humanas.

3.1. Sistemas de diferenciación in vitro de progenitores CD34⁺ TLMPs de timo humano.

Se sembraron $1-2 \times 10^5$ /ml progenitores intratímicos CD34^{hi}CD1a⁻ en pocillos P-24 (*Falcon*) con medio RPMI 1640 (*BioWhittaker*) suplementado con 10% de suero bovino fetal (*Invitrogen*), 100 IU/ml de rhIL-7 (NIBSC, *National Institute for Biological Standards and Control*; actividad específica: 10^6 IU/mg) y 50ng/ml de rhFLT3L (*Preprotech*, actividad específica: 10^6 IU/mg). Estos cultivos se realizaron sobre una monocapa semi-confluyente de células de la línea estromal OP9 derivada de médula ósea de ratón. En diferentes experimentos se utilizaron dos clones distintos de esta línea celular modificados genéticamente por medio de vectores retrovirales que permiten la co-expresión de la proteína verde fluorescente (MigR1-GFP o pLRZS-GFP) con los ligandos de Notch *Delta-like 1* murino (OP9-MigR1-DLL1) o *Jagged-1* humano (OP9-pLRZS-JAG1). Las células OP9-DLL1 fueron cedidas por el Dr. J. C. Zúñiga Pflücker (Department of Immunology, Sunnybrook Research Institute, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada) (Schmitt y Zuniga-Pflucker., 2002). Las células OP9-JAG1 fueron generadas a partir de células OP9 obtenidas de la ATCC (*American Type Culture Collection*) infectadas con el vector retroviral pLRZS-IRES-hJAG1-GFP y seleccionadas por FACS. Los progenitores cultivados se pasaron por filtros de 70 μ m y se replaquearon en pocillos con nuevo estroma cada tres días para evitar sobrecrecimiento. El fenotipo de las diferentes poblaciones generadas se analizó por FACS a diferentes días. En algunos experimentos los progenitores intermediarios CD5⁺p

y CD123⁺p generados a día 3 de cultivo se purificaron por FACS (apartado 1.3) para ser posteriormente cultivados en las mismas condiciones. Con el objetivo de expandir células NK los cultivos se suplementaron con 20ng/ml de rhIL-2 (*NCI Biological Resources Branch*).

3.2. Activación de células dendríticas intratímicas *in vitro*.

La maduración de pDC y cDCs aisladas de timo humano se indujo *in vitro* en cultivos de 24h suplementados con 2,5ng/ml de rhCD40L (*R&D Systems*, actividad específica: 10 IU/ng) y 60ng/ml de rhIL-3 (*NIBSC*, actividad específica: 1700 IU/μg) o 15ng/ml rhTSLP (*R&D Systems*, actividad específica: 3,33 IU/ng), respectivamente. Se comprobó el grado de activación de las DCs cultivadas analizando su morfología por microscopía óptica y la expresión de marcadores de activación tales como CD86 y CD80 por citometría de flujo.

3.3. Generación de células Treg *in vitro*.

Se realizaron cultivos de pDCs primarias inmaduras (IpDCs) o activadas con CD40L e IL-3 (MpDCs) en presencia de timocitos CD4SP CD25⁻ autólogos o alogénicos, o linfocitos T periféricos CD4⁺ CD25⁻ alogénicos a una relación T/DC = 2:1, en placas de 96 pocillos de fondo redondo (*Falcon*). La proliferación de los linfocitos T fue analizada por medio del marcaje de dichas células con CFSE (*Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester, Invitrogen*) y el posterior análisis por citometría de flujo. En otro grupo de experimentos, se cultivaron timocitos S-DP CD69^{lo}, L-DP CD69^{hi} o L-DP CD69^{lo} en presencia de MpDCs o de cDCs activadas con TSLP (McDCs) a una relación timocito DP/ DC=2:1. Los cultivos se realizaron en placas de 96 pocillos (P96) de fondo plano (*Nunc*) sobre una monocapa de células estromales OP9, en presencia de 0,5ng/ml rhIL-7 para favorecer la viabilidad de los timocitos DP y de 20ng/ml de rhIL-2 para favorecer la generación de células Treg, tal y como se ha descrito (Apostolou et al., 2002; Josefowicz y Rudensky, 2009). La expresión de CD25 y Foxp3 fue analizada por citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-CD25 y anti-Foxp3 (*eBioscience*) conjugados con APC y PE, respectivamente. Para determinar la expresión de ICOS (del inglés, *inducible costimulator*) se utilizó un anticuerpo anti-ICOS (Feito et al., 2003) acoplado a FITC, amablemente cedido por la Dra. Pilar Portolés (Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid). En los experimentos de bloqueo funcional, se utilizaron anticuerpos bloqueantes específicos del ligando de ICOS (ICOSL,

2µg/ml; *eBioscience*), anti-CD86 (5µg/ml), anti-CD80 (5µg/ml) (*BD Biosciences*) o la combinación de los dos últimos a una concentración de 5µg/ml cada uno. Como control negativo se emplearon anticuerpos isotípicos irrelevantes (5µg/ml).

4. Ensayos funcionales

4.1. Análisis de la función supresora de las células Treg generadas *in vitro*.

Las células Treg se generaron a partir de linfocitos T periféricos CD4⁺CD25⁻ o de timocitos L-DP CD69^{hi}, L-DP CD69^{lo} o S-DP CD69^{lo} en cocultivos con MpDCs o McDCs durante 7 días como se ha descrito anteriormente. Posteriormente, se enriqueció en células CD25^{hi} o CD25^{lo/-} utilizando técnicas de selección inmunomagnética (AutoMacs). La capacidad immuno-supresora de las células aisladas se determinó en ensayos de proliferación celular, analizando la incorporación de timidina tritiada (³H-Thy) tras 5 días de co-cultivo con linfocitos T periféricos CD4⁺CD25⁻ vírgenes (a diferentes relaciones célula T: célula CD25^{hi} o CD25^{lo/-}) estimulados en placas P96 de fondo plano recubiertas con 10µg/ml de anticuerpos anti-CD3 (UCHT1, *ATCC-AN1009425*) y en medio suplementado con 2µg/ml de anti-CD28 (*BD Biosciences*) y 20ng/ml de rhIL-2 (Fontenot y Rudensky, 2005). En algunos experimentos, el ensayo de supresión se llevó a cabo en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-IL10 (200ng/ml) y anti-IL10R (10ng/ml) (*R&D Systems*) o en presencia del inhibidor II de la kinasa de tipo I (ALK5) asociada al TGF-βRI (1µM, *Calbiochem*) añadidos en el medio cada dos días. Como control de la inhibición se utilizaron Igs irrelevantes de cabra anti-conejo (200ng/ml; *Jackson Immunoresearch Laboratories*), IgG1 de ratón (10ng/ml; *Caltag*) o DMSO (del inglés, *Dimethyl Sulfoxide*).

Para detectar la producción de citoquinas supresoras, se analizaron los sobrenadantes de los cultivos de Treg a día 7. Para la detección de la IL-10 en los cultivos se utilizó el *human IL-10 ELISA* (del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) Kit (*Immunotools*) y para medir TGF-β se empleó el *human TGF-β ELISArray Kit* (*SA Biosciences*).

4.2. Inducción de la expresión de CD40L en timocitos L-DPCD69^{hi} y activación de pDCs dependiente de CD40L.

Los timocitos L-DP CD69^{hi} purificados como se ha descrito previamente se sembraron en pocillos de placas P-24 (5×10^5 células) sin tratar o recubiertos de anti-CD3, en medio suplementado con 2µg/ml de anti-CD28 y 20ng/ml de rhIL-2. Tras 24 horas, se analizó la expresión de CD40L (CD154) por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD40L humano conjugado con APC (*BD Biosciences*). En otro grupo de experimentos, se co-cultivaron timocitos L-DP CD69^{hi} incubados con medio (no estimulados) o activados vía TCR como se ha indicado (estimulados) con pDCs primarias autólogas a una relación final 1:1 en pocillos de placas P-96 de fondo redondo. Los cultivos se suplementaron con 60ng/ml de rhIL-3 para facilitar la supervivencia de las pDCs. Tras 24h de cultivo se analizó la expresión de CD86 (anti-CD86FITC, *BD Biosciences*) por citometría de flujo en la población de pDCs CD123⁺ (anti-CD123-APC, *BD Biosciences*).

5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5.1. PCR semicuantitativa.

El ácido ribonucleico (ARN) total de los timocitos L-DP CD69^{hi}, L-DP CD69^{lo} y S-DP CD69^{lo} procedentes de la misma muestra de timo humano se aisló utilizando *TRIzol* (*Invitrogen*). El ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) se sintetizó a partir de estas muestras tras una incubación de 10 min a 65°C con d(T) oligonucleótidos (*Invitrogen*) utilizando 50IU de la transcriptasa inversa comercial *Expand Reverse Transcriptase* (*Roche*, 50×10^3 IU/ml) en presencia de 1,25mM dNTPs, 0,5 µl de inhibidor de RNasas (*RNAasin*, *Promega*) y 2 µl de DTT 100mM en un volumen final de 20 µl por incubación durante 60 min a 43°C. Finalmente se realizaron diluciones seriadas de ADNc y se amplificó CD40L utilizando oligonucleótidos específicos (5'-ACATACAACCAAACCTTCTCCC-3' y 5'-AGATGTTGTTTTACTGCTGGC-3'; Srahna et al., 2001) durante 35 ciclos en las siguientes condiciones: 30 s de desnaturalización (94°C), 30 s de anillamiento (60°C) y 1 min de extensión (72°C); con una desnaturalización previa de 5 min a 94°C y una extensión final de 72°C durante 5 min. Para la realización de estas reacciones se utilizaron 2,5 IU de Taq polimerasa (*Taq DNA polymerase*; *Roche*).

5.2. PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).

Se generó ADNc a partir de muestras de ARN procedentes de progenitores TLMPs CD34^{hi}CD1a⁻, pDCs y cDCs aislados de muestras de timo humano y progenitores CD5^{lo}CD123⁺ (CD123⁺p) y CD5^{hi}CD123⁻ (CD5⁺p) generados *in vitro*. El ADNc se hibridó con sondas TaqMan individuales o acopladas a tarjetas microfluídicas (análisis para 96 genes por duplicado) (*Applied Biosystems*). El resumen de las sondas TaqMan específicas para los genes analizados en este estudio se muestra en la Tabla 3:

ARNm diana	Referencia sonda TaqMan	ARNm diana	Referencia sonda TaqMan
<i>BMP4</i>	Hs00370078_m1	<i>JAG1</i>	Hs00164982_m1
<i>DLL1</i>	Hs00194509_m1	<i>JAG2</i>	Hs00171432_m1
<i>DLL4</i>	Hs00184092_m1	<i>LEF1</i>	Hs00212390_m1
<i>DELTEX1</i>	Hs00269995_m1	<i>LMO2</i>	Hs00277106_m1
<i>EBF1</i>	Hs00395513_m1	<i>MYB1</i>	Hs00193527_m1
<i>EGR3</i>	Hs00231780_m1	<i>MYC</i>	Hs00153408_m1
<i>ETS-1</i>	Hs00428287_m1	<i>NFKB1</i>	Hs00765730_m1
<i>FOS</i>	Hs00170630_m1	<i>NFKB2</i>	Hs00174517_m1
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1	<i>NOTCH1</i>	Hs00413187_m1
<i>GATA2</i>	Hs00231119_m1	<i>NOTCH2</i>	Hs00225747_m1
<i>GATA3</i>	Hs00231122_m1	<i>NOTCH3</i>	Hs00166432_m1
<i>GFI1B</i>	Hs00180261_m1	<i>NOTCH4</i>	Hs00270200_m1
<i>GLI1</i>	Hs00171790_m1	<i>PAX5</i>	Hs00277134_m1
<i>GLI2</i>	Hs00257977_m1	<i>PTα</i>	Hs00300125_m1
<i>HES1</i>	Hs00172878_m1	<i>RAG1</i>	Hs00172121_m1
<i>HOXA9</i>	Hs00365956_m1	<i>RAG2</i>	Hs00379177_m1
<i>HOXB4</i>	Hs00256884_m1	<i>RUNX1</i>	Hs00231079_m1
<i>ID2</i>	Hs00747379_m1	<i>RUNX3</i>	Hs00231709_m1
<i>ID3</i>	Hs00171409_m1	<i>SMO</i>	Hs00170665_m1
<i>IKZF1(IKAROS)</i>	Hs00172991_m1	<i>SNAI1</i>	Hs00195591_m1
<i>IKZF2(HELIOS)</i>	Hs00212361_m1	<i>SPI1(PU.1)</i>	Hs00231368_m1
<i>IKZF3(AIOLOS)</i>	Hs00232635_m1	<i>SPIB</i>	Hs00162150_m1
<i>IRF4</i>	Hs00180031_m1	<i>TCF12(HEB)</i>	Hs00175295_m1
<i>IRF8</i>	Hs00609879_m1	<i>TCFL5</i>	Hs00232444_m1

Tabla 3. Resumen de las sondas TaqMan utilizadas en los ensayos de Q-PCR.

Las reacciones de amplificación se realizaron en el servicio de genómica del Parque Científico de Madrid y los datos obtenidos fueron normalizados respecto al control endógeno de GAPDH. Posteriormente se analizó la expresión relativa de los diferentes genes comparando poblaciones celulares o condiciones experimentales distintas.

6. Técnicas de inmunohistoquímica.

Se prepararon secciones de entre 5 y 7 μm a partir de fragmentos congelados de timo humano incluidos en *TissueTeK* (Sakura). Las secciones se fijaron en acetona durante 10 min a temperatura ambiente, se secaron durante 16 h y se utilizaron directamente o se almacenaron a -80°C .

6.1. Tinción de células T reguladoras, células epiteliales y células dendríticas plasmacitoides en secciones de timo humano.

Las secciones de timo se hidrataron en PBS a 4°C durante 15 min y a continuación se eliminó la autofluorescencia del tejido por tratamiento con NH_4Cl 50mM. La inespecificidad se redujo bloqueando los receptores Fc de las muestras con PBS, 5% BSA, 5% HNS (*Human Normal Serum*) y 5% de suero de cabra. En aquellas tinciones en las que se utilizaron anticuerpos conjugados a biotina, se realizó un bloqueo adicional de la biotina y la avidina endógena utilizando el Kit comercial *Avidin/biotin blocking kit* (Vector).

Para las tinciones de células pDCs y Tregs, las secciones de timo se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con anticuerpos anti-CD123 humano (IgG1 de ratón; dilución 1:100, *BioLegend*) y anti-Foxp3 humano conjugado a biotina (dilución 1:100, *ebiosciences*), respectivamente. Para revelar las tinciones de CD123 y Foxp3 se utilizaron anticuerpos de cabra anti-Igs de ratón conjugados a Alexa-488 (dilución 1:500, *Invitrogen*) y estreptavidina unida a Alexa-455 (dilución 1:500, *Invitrogen*), respectivamente, incubando durante 1h a temperatura ambiente.

La detección de las TECs se realizó mediante tinción con anticuerpos anti-Pan citoqueratinas (*Sigma*) y anticuerpos anti-IgGs de ratón conjugados a Alexa-488 (1:500, *Invitrogen*). Los núcleos fueron identificados en todas las secciones con TOPRO-3 (1:500, *Invitrogen*).

6.2. Adquisición y análisis de imágenes por microscopía confocal.

Las imágenes de los cortes de tejido tímico se obtuvieron en un microscopio confocal LSM510 (Zeiss) utilizando objetivos de magnificación 10X (apertura numérica 0,3), 25X (apertura numérica 0,8, y zoom de 2) y 40X (apertura numérica 1,3) y el programa LSM510.4.2. El posterior análisis de las imágenes se llevó a cabo utilizando el programa *Zeiss LSM Image browser* versión 4.2.

7. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos obtenidos en los distintos experimentos se realizó mediante el uso de un test t de *Student* no pareado o pareado, según el experimento. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con una $P < 0,01$ (**) o $P < 0,05$ (*).

RESULTADOS

I. DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS nTreg HUMANAS: FUNCIÓN TOLEROGÉNICA DE LAS pDCs INTRATÍMICAS.

1. Caracterización de las DCs intratímicas y de sus factores de activación.

1.1 Identificación de poblaciones de pDCs y cDCs inmaduras y pDCs activadas residentes en el timo humano.

Con el objetivo de analizar las diferentes poblaciones de DCs residentes en el timo humano postnatal, se utilizaron técnicas de enriquecimiento en poblaciones no-T a partir de suspensiones de timocitos totales, mediante *rosetas con eritrocitos de carnero activados* (ver Materiales y Métodos, apartado 1.1.1.), y posteriormente se eliminaron Mos/Mφs CD14⁺. En la fracción resultante se detectaron pDCs y cDCs, caracterizadas por una expresión diferencial de los marcadores CD123 y CD13, definiéndose como células CD123^{hi} CD13⁻ (R1) y CD123^{lo} CD13⁺ (R2), respectivamente (Figura 8A). Como se ha descrito previamente (de Yébenes et al., 2002; Bendriss-Vermare et al., 2001; Shortman et al., 2002), los timocitos que expresan niveles elevados de CD123 ($0,05 \pm 0,006\%$ del total de timocitos, n=40) carecen de los marcadores mieloides CD13 y CD11c, pero expresan el marcador de pDCs BDCA2. Por el contrario, las células CD13⁺ ($0,026 \pm 0,003\%$, n=40) poseen un fenotipo mieloides BDCA2^{lo/-} CD11c⁺ CD123^{lo}, característico de cDCs (Figuras 8A, 8B). Además, las células CD123^{hi} CD13⁻ muestran alta expresión de CD45RA y baja de CD45RO, como se ha descrito para pDCs (de Yébenes et al., 2002; Bendriss-Vermare et al., 2001; Shortman et al., 2002), mientras que las células CD123^{lo} CD13⁺ expresan niveles homogéneamente altos de CD45RO y heterogéneos de CD45RA (Figura 8B). Para analizar el estado de activación *in vivo* de ambos tipos de DCs, se cuantificó la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD86 y CD80 cuya inducción es característica en DCs activadas (Kawamura y Furue, 1995). Como se muestra en la Figura 8B, las pDCs y cDCs intratímicas carecen de CD80 en su membrana, mientras que la expresión de CD86 es negativa para la población de pDCs o muy baja en cDCs. Por tanto, ambos tipos de DCs poseen un fenotipo de células inmaduras.

Además de las dos subpoblaciones descritas de DCs, la expresión de CD123 y CD13 nos permitió identificar una población de células CD123^{lo} CD13⁻ ($0,062 \pm 0,014\%$, R3, Figura 8A) que carecen de la expresión del marcador mieloides CD11c, pero que muestran alta expresión de CD45A y baja de CD45RO, de forma similar a las pDCs. Sin embargo,

estas células difieren de las últimas en los altos niveles de expresión de HLA-DR, CD80 y CD86 y en la baja expresión de BDCA2 (Figura 8B). Puesto que se ha descrito que las pDCs humanas activadas *in vitro* pierden la expresión de BDCA2 y reducen los niveles de CD123 en la membrana plasmática (Vendriess-Vermare et al., 2001 y Srahna et al., 2001), nuestros resultados sugieren que la población de timocitos CD123^{lo} CD13⁻ podría incluir pDCs activadas. **Por tanto, en el timo humano residen pDCs y cDCs inmaduras y una población de timocitos CD123^{lo} CD13⁻ con fenotipo similar al de las pDCs activadas.**

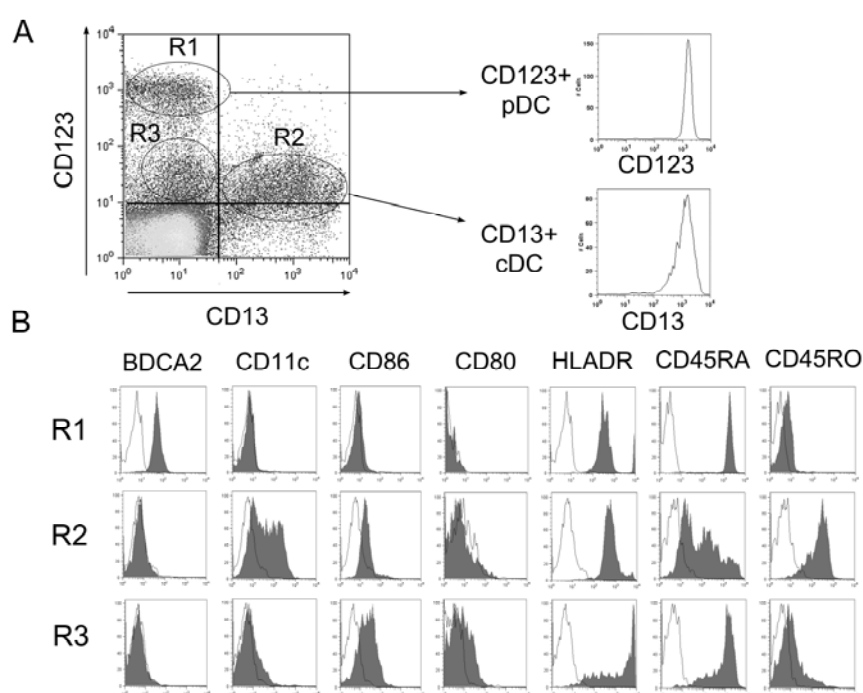


Figura 8. En el timo humano residen pDCs y cDCs inmaduras, junto con pDCs activadas. (A) El análisis por citometría de flujo de la expresión de CD123 vs CD13 en suspensiones de timocitos carentes de células T maduras y Mos/Mφs definió la presencia de células CD123⁺CD13⁻ (R1), CD123^{lo}CD13⁺ (R2) y CD123^{lo}CD13⁻ (R3) (histograma izquierdo). La expresión recíproca de CD123 y CD13 en R1 y R2 se utilizó como criterio de selección de las poblaciones de pDCs y cDCs, cuyo fenotipo se muestra en los histogramas de la derecha (n=10) (B) Análisis por citometría de flujo de la expresión de BDCA2, CD11c, CD86, CD80, HLA-DR, CD45RA y CD45RO en las poblaciones definidas en (A) (histogramas sombreados). Los histogramas no sombreados representan los controles de fluorescencia con anticuerpos irrelevantes. Los datos corresponden a un experimento representativo (n=4).

1.2. Las pDCs y cDCs inmaduras residentes en el timo humano se activan en respuesta a diferentes estímulos.

Se sabe que las cDCs residentes en el timo humano son capaces de activarse en respuesta al TSLP producido por las células epiteliales de los corpúsculos de Hassal (Watanabe et al., 2005). Nuestros datos sugerían la existencia de pDCs activadas *in vivo* en el timo humano. Sin embargo, la capacidad de respuesta de las pDCs intratímicas a TSLP no había sido analizada. Para abordar esta cuestión, aislamos pDCs y cDCs intratímicas por medio de técnicas de selección inmunomagnética, considerando la expresión diferencial de CD123 y CD13 en ambos tipos de DCs (ver Materiales y Métodos, apartado 1.1.2.), obteniendo unas purezas del $96 \pm 1,6 \%$ y $97,96 \pm 0,9\%$, respectivamente ($n=4$; Figura 8A). Las DCs aisladas fueron cultivadas en presencia de TSLP para posteriormente analizar la viabilidad celular y la expresión de marcadores de activación. Como se muestra en la Figura 9A, el número de pDCs recuperadas tras 24h de cultivo en presencia de TSLP fue aproximadamente 4 veces inferior ($4,34 \pm 1,45$; $n=3$) al de cDCs cultivadas en las mismas condiciones. Al analizar el fenotipo de estas células, se observó la inducción de CD86 y CD80 en las cDCs cultivadas con TSLP, mientras que las pDCs mostraron baja expresión de estas moléculas. Por tanto, las cDCs, pero no las pDCs, se activan y maduran en respuesta a TSLP (Figura 9B). No obstante, las pDCs intratímicas son capaces de activarse en condiciones de activación convencionales (CD40L e IL-3), ya descritas para sus homólogos en la periferia (Grouard et al., 1997), observándose un incremento en la viabilidad celular (Figura 9A) y en la expresión de CD86 y CD80 (Figura 9B) similar al obtenido para las cDCs activadas en respuesta a TSLP (pDCs vs cDCs: $57,6 \pm 7,0\%$ CD86⁺ y $64,8 \pm 10,4\%$ CD80⁺ vs $83,8 \pm 3,1\%$ CD86⁺ y $52,4 \pm 13,1\%$ CD80⁺; $n=3$). La maduración de pDCs intratímicas en respuesta a CD40L e IL-3 se vio acompañada por la formación de agregados celulares y el desarrollo de prolongaciones de la membrana, dando lugar a una morfología típica de DCs activadas (Figura 9C).

En conclusión, las pDCs de timo humano, al contrario que las cDCs, son incapaces de activarse y sobrevivir tras ser estimuladas con TSLP, pero lo hacen en respuesta a CD40L e IL-3.

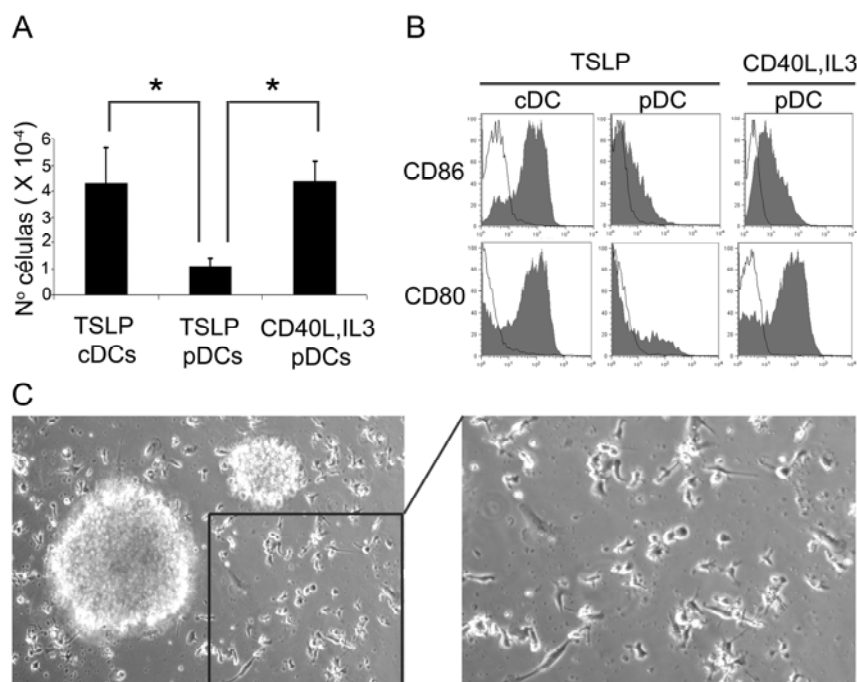


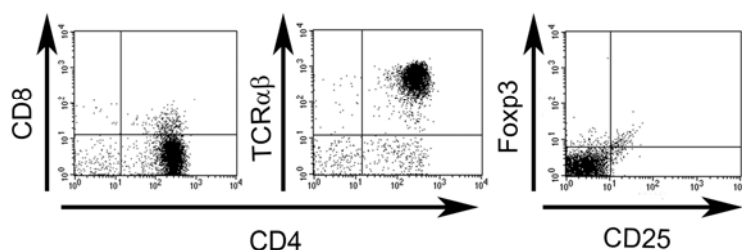
Figura 9. Las pDCs y cDCs intratímicas se activan en respuesta a distintos estímulos. (A) Números absolutos de pDCs estimuladas durante 24h con TSLP o con CD40L e IL-3 y de cDCs cultivadas con TSLP. Los números fueron normalizados para 10^5 células iniciales. Los datos representan los valores medios \pm SD de tres experimentos independientes. *, $P < 0,05$. (B) Las pDCs maduran en respuesta a CD40L e IL3 pero no a TSLP. Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD86 y CD80 (histogramas sombreados) en pDCs y cDCs cultivadas como se ha descrito en (A). (C) Imágenes de microscopía de campo claro procedentes de cultivos de pDCs estimuladas con CD40L e IL3 durante 24h. Se muestra un campo representativo (imagen izquierda, ampliación original 40X) y una ampliación del mismo (imagen derecha).

2. Capacidad tolerogénica de las pDCs de timo humano. Implicación en la generación de nTregs.

La descripción de que las cDCs de timo humano activadas con TSLP eran capaces de inducir la diferenciación de células Treg $CD25^+$ $Foxp3^+$ en cultivos de timocitos $CD4SP$ alogénicos (Watanabe et al., 2005), nos animó a utilizar el mismo sistema experimental para analizar la posible función tolerogénica de las pDCs intratímicas. Puesto que el estado de activación de las DCs parece determinar su capacidad tolerogénica en la periferia (Steinman et al., 2003; Wakkach et al., 2003), analizamos comparativamente la capacidad de pDCs inmaduras (IpDCs) aisladas *ex vivo* y de pDCs maduras, activadas durante 24h con CD40L e IL-3 (MpDCs), para inducir la generación de Tregs a partir de dos poblaciones de células

allogénicas: timocitos CD4SP CD25⁻ o linfocitos T CD4⁺ CD25⁻ de sangre periférica (CD4PB) (Figura 10). Para examinar la capacidad tolerogénica de las IpDCs y MpDCs en condiciones más fisiológicas, también realizamos co-cultivos con timocitos CD4SP CD25⁻ autólogos. En todos los casos, cuantificamos la proliferación celular por marcaje con CFSE y analizamos la generación de Tregs CD25⁺ Foxp3⁺ en respuesta a ambos tipos de pDCs tras 7 días de cultivo.

A Timocitos CD4SP



B Linfocitos CD4PB

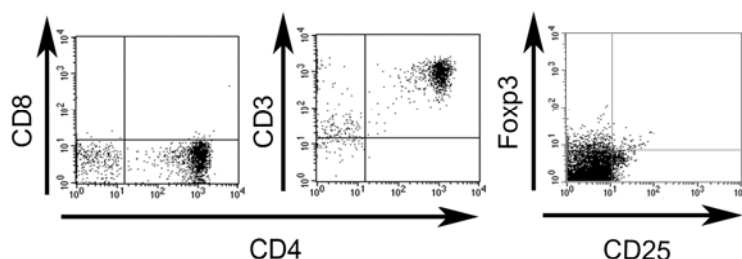


Figura 10. Fenotipo de timocitos CD4SP y linfocitos CD4PB tras su aislamiento.

Análisis por citometría de flujo de timocitos CD4⁺CD8⁻ (CD4SP) (A) y linfocitos CD4⁺ de sangre periférica (CD4PB) (B) tras su aislamiento por selección magnética. En ningún caso se detectó la presencia de células Treg CD25⁺ Foxp3⁺. Los resultados son representativos de un experimento (n=5).

Como se muestra en la Figura 11A, las IpDCs indujeron niveles prácticamente indetectables de CD25 en una proporción muy baja de cualquiera de los tipos de células con los que fueron cultivadas. El análisis por citometría de flujo del marcaje de CFSE reveló que la intensidad de fluorescencia era similar en los linfocitos CD25⁺ o CD25⁻ e igual a la observada en cultivos desprovistos de DCs, indicando la ausencia de proliferación en respuesta a las IpDCs. El análisis de la expresión de Foxp3 en estos timocitos mostró asimismo la ausencia de células positivas. Por tanto, las IpDCs son incapaces de inducir la generación de células Treg a partir de timocitos o linfocitos T periféricos CD4⁺.

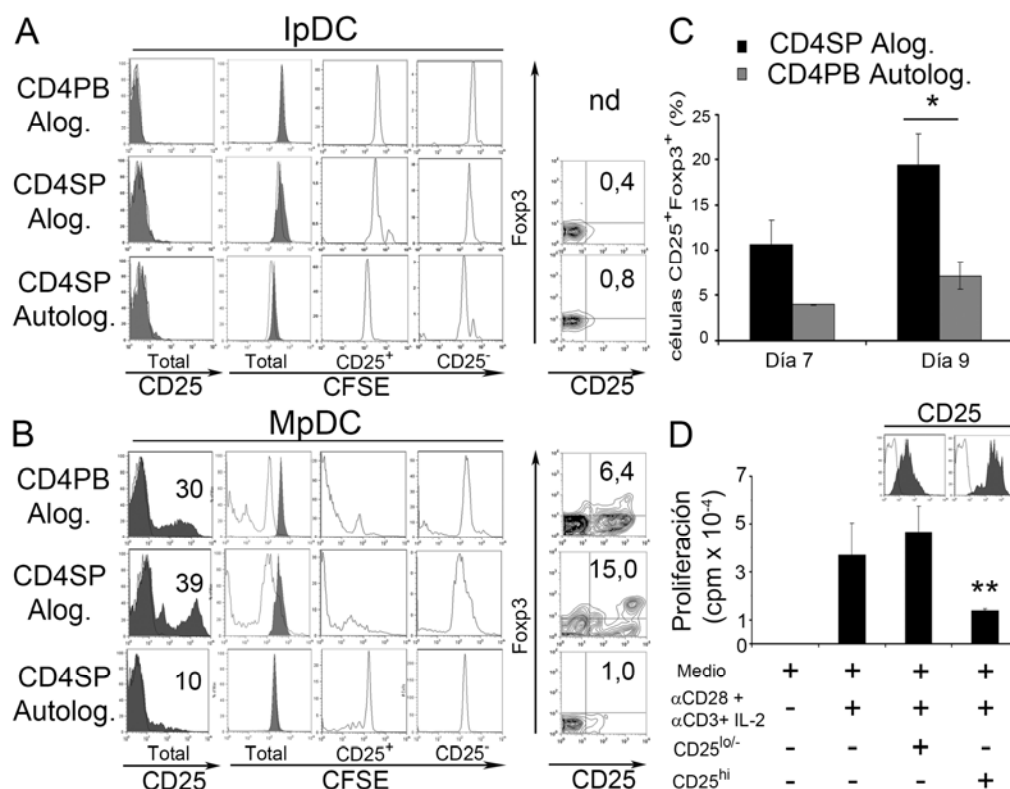


Figura 11. Las pDCs intratímicas adquieren potencial tolerogénico tras su activación con CD40L e IL-3. Se cultivaron pDCs bien (A) inmaduras aisladas *ex vivo* (IpDCs) o (B) activadas en respuesta a CD40L e IL-3 (MpDCs) con timocitos CD4SP autólogos o alogénicos, o con linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica (CD4PB) alogénicos, previamente marcados con CFSE. Se analizó la expresión de CD25 en la población total (histogramas izquierdos sombreados) y el marcaje de CFSE en la población total y en las poblaciones CD25⁺ y CD25⁻ a día 7 de cultivo (histogramas no sombreados). El marcaje de CFSE correspondiente a los linfocitos o timocitos totales cultivados en ausencia de DCs se representa en los histogramas sombreados a la izquierda. Los números corresponden al porcentaje de células CD25⁺ totales. El análisis de la expresión de CD25 vs Foxp3 del total de células cultivadas se muestra en los histogramas biparamétricos de la derecha. Los números corresponden a los porcentajes de células CD25⁺ Foxp3⁺. Los resultados corresponden a un experimento representativo (n=3). (C) Números relativos de células CD25⁺ Foxp3⁺ generadas en co-cultivos de timocitos CD4SP o de linfocitos CD4PB alogénicos y MpDCs. Los datos representan el porcentaje medio ± SEM de tres experimentos independientes. *, $P < 0,05$. (D) Función supresora de las células CD25^{hi} obtenidas de los co-cultivos de linfocitos CD4PB alogénicos y MpDCs. Se cultivaron células T vírgenes periféricas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 e IL-2 (50UI/ml), bien en ausencia (control) o en presencia de células CD25^{hi} o CD25^{lo/-} aisladas por selección inmunomagnética. Los datos representan la media ± SEM de la incorporación de ³H-Thy (c.p.m.) a día 5 de un experimento representativo realizados por triplicado (n=5). **, $P < 0,01$.

Por el contrario, las MpDCs indujeron eficientemente la expresión de CD25 en linfocitos CD4PB y timocitos CD4SP alogénicos, y de forma más débil en timocitos CD4SP autólogos ($47,6 \pm 24\%$; $39 \pm 24\%$ y $15,4 \pm 8\%$ CD25⁺, respectivamente; n=3; Figura 11B).

La inducción de CD25 se correlacionó con la pérdida del marcaje de CFSE, indicando la inducción de proliferación específicamente en la población de células CD25⁺. Por tanto, las MpDCs, al contrario que las IpDCs, son capaces de inducir una respuesta proliferativa en linfocitos T y timocitos CD4⁺ alogénicos. Por el contrario, los timocitos CD4SP autólogos CD25⁺ no mostraron una proliferación significativa. En todos los casos, las células CD25⁻ mantuvieron una marca de CFSE similar a la de los controles cultivados sin DCs, como corresponde a células no activadas en estado de reposo (Figura 11B).

El análisis fenotípico de los cultivos mostró que las MpDCs indujeron la expresión de Foxp3 en las células CD25⁺ derivadas de los linfocitos T y timocitos alogénicos, siendo estos últimos más eficientes que los primeros en la generación de células nTreg CD25⁺ Foxp3⁺ ($3,9 \pm 0,06\%$ vs $10,65 \pm 2,6\%$, respectivamente a día 7 y $7,1 \pm 1,5\%$ vs $19,3 \pm 3,5\%$, respectivamente a día 9) (Figura 11C). Sin embargo, no se observó generación de células CD25⁺ Foxp3⁺ a partir de timocitos CD4SP autólogos (Figura 11B) y los cultivos con estas células no progresaron más allá de día 7, debido a la ausencia de proliferación. Puesto que la expresión de Foxp3 era indetectable en las poblaciones de linfocitos CD4PB o timocitos CD4SP tras su aislamiento (Figura 10), o tras el cultivo con IpDCs (Figura 11A), nuestros resultados demuestran que la inducción de Foxp3 y la diferenciación de las células nTreg requiere específicamente la participación de MpDCs.

Para confirmar que las células CD25⁺ Foxp3⁺ eran efectivamente células nTreg, realizamos experimentos funcionales en los que analizamos por separado la capacidad supresora de las células con expresión alta de CD25 (CD25^{hi}), o con niveles bajos/indetectables (CD25^{lo/-}), aisladas de nuestros cultivos, utilizando ensayos de proliferación convencionales. Como se muestra en la Figura 11D, las células CD25^{hi}, pero no las CD25^{lo/-}, inhibieron significativamente la proliferación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes de sangre periférica activados con anti-CD3, anti-CD28 e IL-2 ($60,8 \pm 9,7\%$ de inhibición en 3 experimentos independientes).

Por tanto, nuestros datos indican que las pDCs intratímicas, tras su activación con CD40L e IL-3, adquieren potencial tolerogénico y pueden inducir la generación de células nTreg alogénicas funcionales.

3. Los precursores de las células nTreg son timocitos DP CD69^{hi} TCRαβ^{hi}.

Los resultados obtenidos sugerían que, en condiciones fisiológicas, la población de timocitos CD4SP convencionales no incluiría células capaces de activarse y generar nTregs tras el reconocimiento de Ags propios presentados por MpDCs autólogas, probablemente debido a su eliminación durante el proceso de selección negativa. Por el contrario, tales progenitores deberían ser timocitos más inmaduros con TCRs autorreactivos que, habiendo sido seleccionados positivamente, no hubieran afrontado aún el proceso de selección negativa. Por tanto, cabría esperar que tales progenitores se encontrasen incluidos en la población de timocitos DP TCRαβ⁺ recién seleccionados positivamente, como se ha sugerido en ratón (Cabarrocas et al., 2006). Con el objetivo de explorar esta hipótesis, decidimos analizar el potencial Treg de diferentes poblaciones de timocitos DP.

3.1. CD69 y TCRαβ definen dos poblaciones de timocitos DP residentes en el timo humano.

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que los timocitos humanos DP incluyen dos poblaciones de células con diferente tamaño y densidad: timocitos DP grandes, activados mediante el proceso de selección positiva y timocitos DP pequeños, que aún no han sido seleccionados y no están activados (Trigueros et al., 1998). Para separar ambas poblaciones, utilizamos gradientes de densidad y selección inmunomagnética (ver Materiales y Métodos) y enriquecimos selectivamente en timocitos DP grandes o pequeños (L-DP y S-DP, > 95% CD4⁺CD8⁺; Figura 12A) en las fracciones de Percoll de densidad 1,068 ó 1,08, respectivamente. Los timocitos L-DP contenían bajos porcentajes de células TCRαβ⁺ (27,3 ± 6,5%) que estaban enriquecidas en células con niveles elevados del TCR (TCR^{hi}, IF: log3; 42,7 ± 8,4% del total de timocitos TCRαβ⁺). Por el contrario, los timocitos S-DP eran en su mayoría células TCRαβ⁺ (65,6 ± 3,0%) con niveles de expresión intermedios o bajos del TCR (TCR^{lo/int}, IF: log1-2). Cabe destacar que básicamente todos los timocitos L-DP TCR^{hi} mostraban elevados niveles de expresión del marcador temprano de activación CD69 (CD69^{hi}, IF: log2-3), coincidiendo con el fenotipo esperado para timocitos DP seleccionados positivamente (Vanhecke et al., 1997). Por otro lado, los timocitos S-DP TCR^{lo/int} eran principalmente células no activadas con bajos niveles de expresión de CD69 (CD69^{lo}, IF: log1-2; Figura 12A).

Basándonos en estos resultados, utilizamos la expresión del antígeno CD69 como criterio de selección de las células activadas contenidas en la población L-DP. Mediante selección inmunomagnética de las células CD69⁺ L-DP, aislamos una población enriquecida en células TCRαβ⁺ ($46,1 \pm 8,2$ % del total, n=4) con un alto porcentaje de células CD69^{hi} ($62,1 \pm 7,3$ % en la población TCRαβ⁺, n=4). Esta fracción será denominada a partir de ahora L-DP CD69^{hi} (Figura 13A izquierda). Por otro lado, los timocitos S-DP, que básicamente carecían de células CD69^{hi} ($6,4 \pm 0,9$ % CD69^{hi} en la población TCRαβ⁺, n=4), no fueron fraccionados y nos referiremos a ellos como S-DP CD69^{lo} (Figura 13A, izquierda). Es importante destacar que no se encontraron células CD25⁺ Foxp3⁺ en ninguna de las dos poblaciones de timocitos DP, aunque la población L-DP CD69^{hi} contenía una pequeña proporción de células CD25⁺ Foxp3⁺ ($7,9 \pm 2,3$ %), cuya relevancia como precursores comprometidos al linaje de nTregs es controvertida (Tuovinen et al., 2008) (Figura 12B).

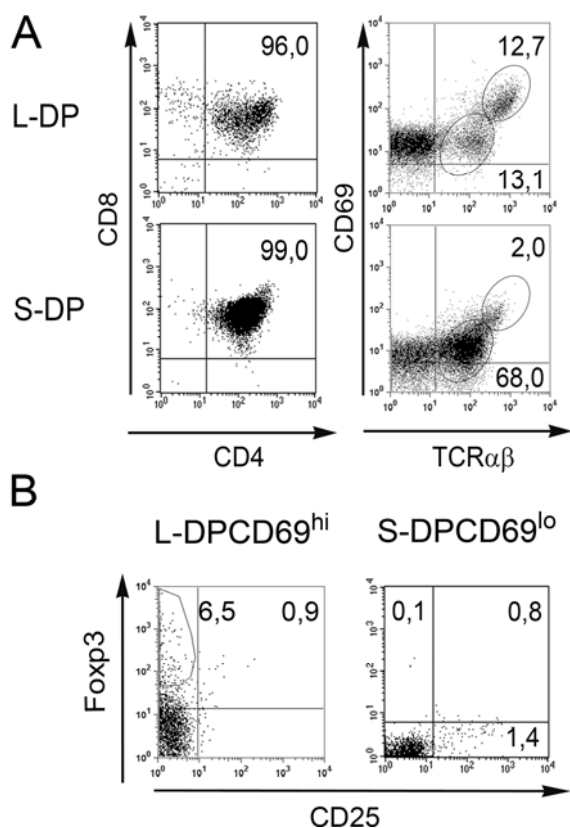


Figura 12. Las poblaciones de timocitos DP grandes o pequeños están diferencialmente enriquecidas en células TCR^{hi} CD69^{hi} y no contienen nTregs CD25⁺ Foxp3⁺. (A) Análisis de la expresión de CD4 vs CD8 y TCRαβ vs CD69 por citometría de flujo en las poblaciones de timocitos DP de tamaño grande (L-DP) y pequeño (S-DP) aisladas por gradientes de Percoll y separación inmuno-magnética. (B) Expresión de Foxp3 vs CD25 en timocitos L-DP enriquecidos en células CD69^{hi} por selección magnética (L-DP CD69^{hi}) o timocitos S-DP no fraccionados (S-DP CD69^{lo}). Los números en los cuadrantes indican los porcentajes de células positivas. Los datos corresponden a un experimento representativo de tres.

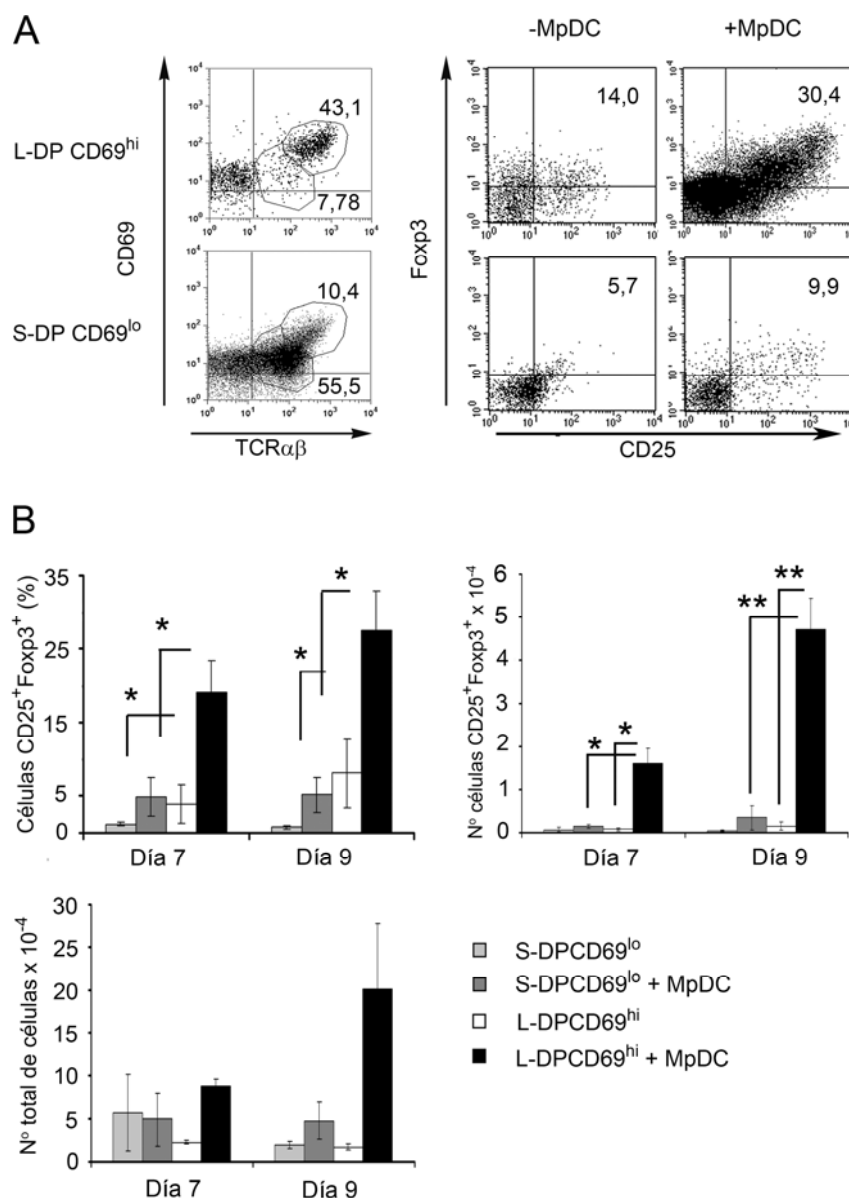
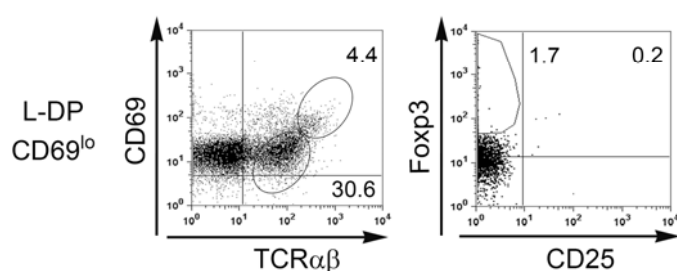


Figura 13. Las pDCs activadas inducen la generación de células nTreg a partir de timocitos autólogos DP CD69^{hi} TCRαβ^{hi} que han sido seleccionados positivamente. (A) Expresión de CD69 vs TCRαβ en timocitos primarios DP grandes, enriquecidos en células CD69^{hi} (L-DP CD69^{hi}), y timocitos DP pequeños no seleccionados, con niveles bajos de expresión de CD69 (S-DP CD69^{lo}) (histogramas a la izquierda). Los números indican los porcentajes de las poblaciones dentro de las áreas destacadas. A la derecha se muestra la expresión de Foxp3 vs CD25 en las células generadas a día 7 a partir de timocitos L-DP CD69^{hi} y S-DP CD69^{lo} co-cultivados sobre células estromales OP9, suplementadas con IL-2 e IL-7, en ausencia o presencia de MpDCs autólogas. Los números representan los porcentajes de células CD25⁺ Foxp3⁺. (B) Números relativos (arriba, izquierda) y absolutos (arriba, derecha) de células CD25⁺ Foxp3⁺ generadas a partir de timocitos L-DP CD69^{hi} y S-DP CD69^{lo} cultivados como se describe en (A). En el gráfico inferior se representan los números totales en esos cultivos. Los datos corresponden a los valores medios \pm SEM de tres experimentos. *, $P < 0,05$.

3.2. Los timocitos DP CD69^{hi} TCRαβ^{hi} generan células nTregs en respuesta a pDCs autólogas maduras.

Para analizar el potencial nTreg de las poblaciones de timocitos L-DP CD69^{hi} y S-DP CD69^{lo} realizamos cultivos de estas células en ausencia o presencia de MpDCs autólogas y analizamos el fenotipo de la progenie generada a día 7 (Figura 13A derecha). La presencia de MpDCs indujo la generación de células CD25⁺ Foxp3⁺ de forma eficiente a partir de timocitos L-DP CD69^{hi}. Estos timocitos, sin embargo, fueron muy poco eficientes generando células CD25⁺ Foxp3⁺ en ausencia de MpDCs (hasta 30 veces menos) y las células generadas mostraron bajos niveles de CD25 y Foxp3, sugiriendo una diferenciación incompleta (Figura 13A derecha, 13B). Por tanto, la generación de células CD25⁺ Foxp3⁺ requiere selectivamente el concurso de células MpDCs.

A



B

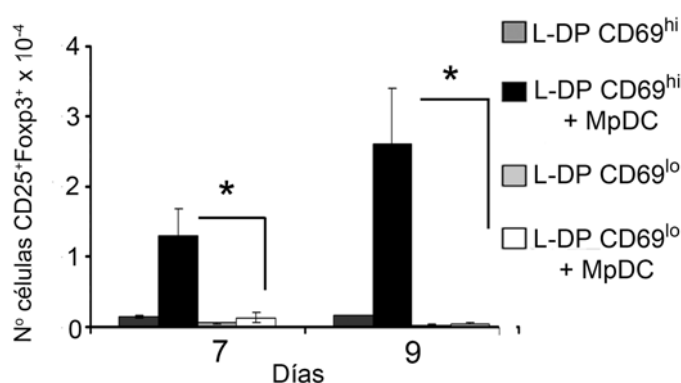


Figura 14. Los progenitores de Tregs residen específicamente en la población de células L-DP CD69^{hi}. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD69 vs TCRαβ y Foxp3 vs CD25 en timocitos L-DP tras la eliminación de células CD69^{hi} (L-DP CD69^{lo}). Los números en los cuadrantes indican los porcentajes de células positivas en un experimento representativo (n=3). (B) Números absolutos de células CD25⁺ Foxp3⁺ generadas a partir de timocitos L-DP CD69^{hi} o L-DP CD69^{lo} co-cultivados durante 7 o 9 días en presencia o ausencia de MpDCs autólogas. Los datos representan los valores medios ± SEM de tres experimentos. *, $P < 0,05$.

Por su parte, los timocitos S-DP CD69^{lo} generaron muy bajas proporciones de células CD25⁺ Foxp3⁺, incluso en presencia de MpDCs (Figura 13A y 13B). De igual manera, los timocitos L-DP CD69^{lo}, obtenidos tras la eliminación de las células CD69^{hi} de la población L-DP, fueron ineficientes proliferando y generando células CD25⁺ Foxp3⁺ en respuesta a MpDCs

autólogas (Figura 14). Estos datos indican que el potencial de generación de células $CD25^+ Foxp3^+$ se restringe a la población DP de timocitos grandes que expresan altos niveles de CD69. En conjunto, nuestros resultados demuestran una función esencial de las MpDCs en la generación de células $CD25^+ Foxp3^+$ y sugieren que este proceso depende de la diferenciación *de novo* de los precursores nTregs presentes *in vivo* en la población de timocitos autólogos L-DP $CD69^{hi}$. Confirmando la diferenciación *de novo* de estos progenitores, observamos que la adquisición del fenotipo $CD25^+ Foxp3^+$ se acompañaba de la pérdida de expresión de CD8 en los timocitos L-DP $CD69^{hi}$ y la consiguiente generación de células $CD4^+ CD8^-$ (Figura 15, histogramas superiores). De hecho, los niveles de CD25 y Foxp3 se incrementaron a lo largo del proceso de diferenciación, conforme se perdía la expresión de CD8 en la población DP, estando los niveles más elevados restringidos a la población $CD4^+ CD8^-$ (Figura 15, histogramas inferiores).

Por tanto, nuestros datos indican que los progenitores de las nTregs del timo humano residen en una población de timocitos DP activados como consecuencia del proceso de selección positiva, que requieren la participación selectiva de células pDCs maduras para inducir su diferenciación.

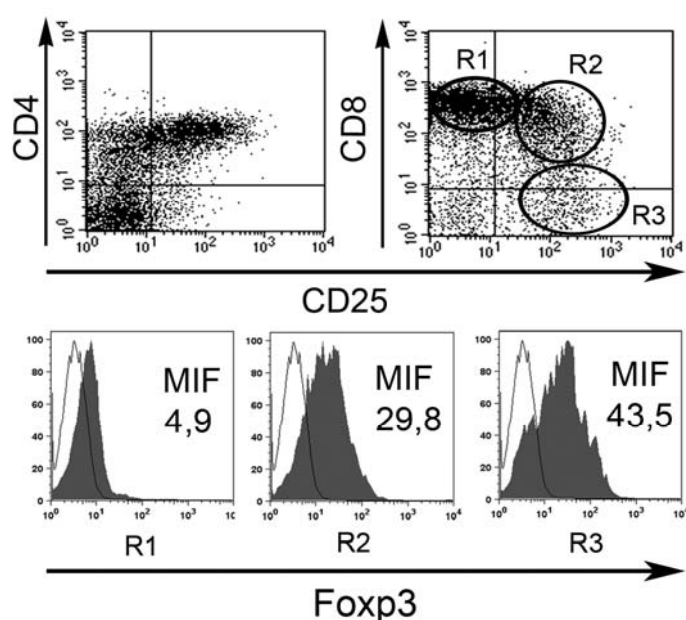


Figura 15. Los timocitos L-DP $CD69^{hi}$ inducen la expresión de CD25 y Foxp3 en respuesta a MpDCs y se diferencian en células $CD4^+CD8^-$. Análisis de la expresión de CD4 (izquierda) o CD8 (derecha) vs CD25 en timocitos L-DP $CD69^{hi}$ cultivados en presencia de MpDCs. Los histogramas inferiores muestran la expresión de Foxp3 en las poblaciones de células $CD8^{hi}CD25^-$ (R1), $CD8^{int}CD25^+$ (R2) y $CD8^-CD25^+$ (R3) definidas en las correspondientes regiones el histograma superior derecho.

4. Las pDCs y cDCs intratímicas inducen la diferenciación de dos tipos funcionales de células nTreg.

4.1. Las pDCs y cDCs activadas inducen la diferenciación de células nTreg con distintos patrones de producción de citoquinas.

La descripción de que las cDCs intratímicas adquieren propiedades tolerogénicas en respuesta a TSLP en sistemas alogénicos (Watanabe et al., 2005) planteaba la posibilidad de que estas células fueran asimismo eficientes induciendo la generación de nTregs a partir de timocitos L-DP CD69^{hi} autólogos, como habíamos observado para las MpDCs. Para estudiar esta posibilidad, se aislaron cDCs y pDCs de la misma muestra de timo, se activaron con TSLP (McDCs) o CD40L e IL-3 (MpDCs), respectivamente, y se cultivaron con timocitos L-DP CD69^{hi} autólogos, analizando la generación de células nTreg a día 7 y 9. Como se muestra en la Figura 16A, ambos tipos de DCs indujeron la generación de células CD25⁺ Foxp3⁺, aunque las MpDCs fueron ligeramente más eficientes en términos relativos y significativamente más eficientes en términos absolutos. Estos datos sugieren un efecto específico de las MpDCs en la expansión y/o supervivencia de las células nTreg diferenciadas *in vitro* (Figura 16A, superior). Para comparar la función reguladora de las células CD25^{hi} generadas en presencia de MpDCs o McDCs (referidas como CD25^{hi}-pDC y CD25^{hi}-cDC, respectivamente; Figura 16B), se realizaron ensayos convencionales de supresión, utilizando diferentes números de células Treg. Ambos tipos de células CD25^{hi} fueron capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ activados vía TCR, aunque las células CD25^{hi}-pDC fueron más eficientes (Figura 16C). Finalmente, para identificar posibles diferencias funcionales de los dos subtipos de nTregs, determinamos el patrón de expresión de citoquinas presentes en los sobrenadantes de los co-cultivos con MpDCs o McDCs. Como se muestra en la Figura 16D, las células CD25^{hi}-pDC fueron más eficientes en la secreción de IL-10 que las células CD25^{hi}-cDC, siendo éstas mejores productoras de TGF- β que las primeras. Para abordar si esta expresión diferencial de citoquinas estaba implicada en una función específica de cada subtipo de nTreg, realizamos los ensayos supresores en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-IL10R/ anti-IL-10R o de inhibidores de la señalización del receptor de TGF- β (TGF β R). El bloqueo de la vía IL-10/IL-10R redujo específicamente la capacidad de las células CD25^{hi}-pDC de inhibir la proliferación de células T activadas. Por el contrario, la función de las células CD25^{hi}-cDC fue significativamente reducida en presencia

del inhibidor de la señalización del TGF β R (Figura 16E). Por tanto, las pDCs y cDCs de timo humano son capaces de promover la diferenciación de nTregs autólogas con características inmunosupresoras diferentes.

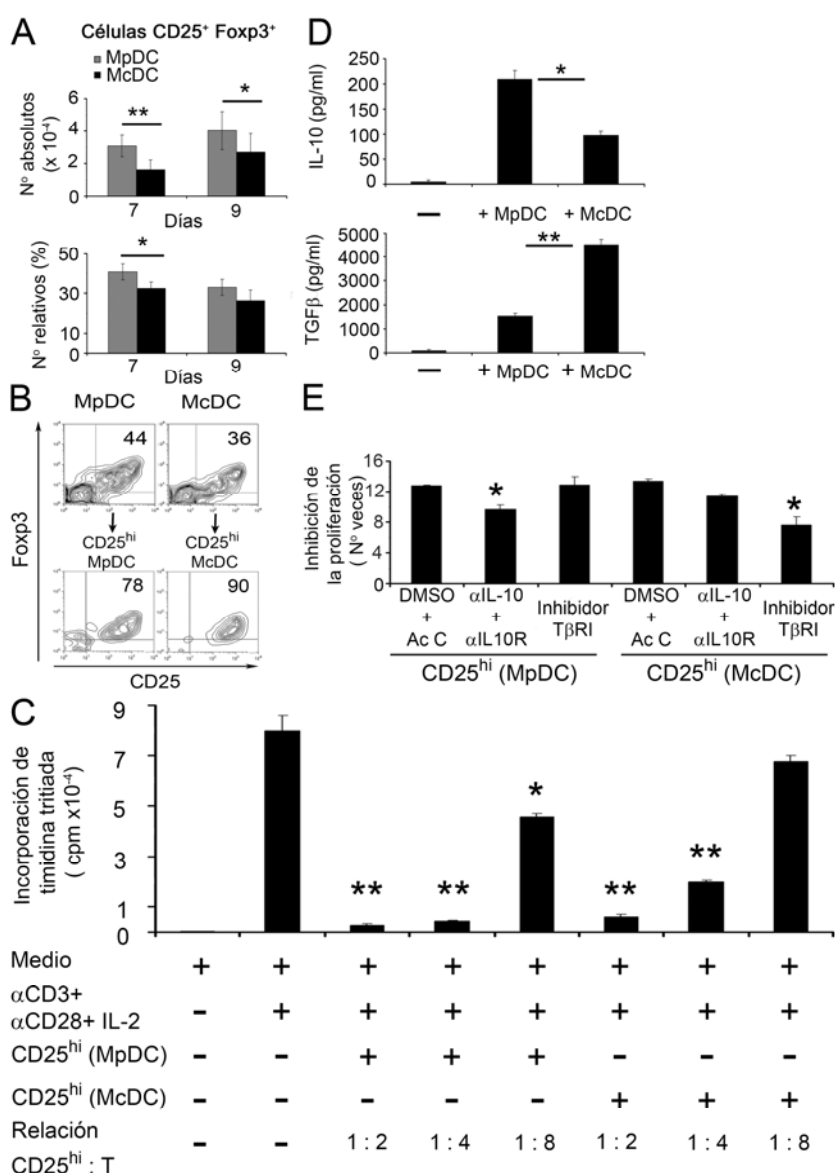


Figura 16. Las pDCs y cDCs de timo humano inducen la diferenciación de células nTreg con perfiles distintos de expresión de citoquinas. (A) Números absolutos (panel superior) y relativos (panel inferior) de células CD25⁺ Foxp3⁺ derivadas de timocitos DP CD69^{hi} TCR $\alpha\beta$ ^{hi} co-cultivados con MpDCs o McDCs autólogas. Los datos representan los valores medios \pm SEM de cuatro experimentos *, $P < 0,05$ y **, $P < 0,01$ (B) Expresión de CD25 vs Foxp3 en las células generadas en (A) a día 7 (paneles superiores) y en la población CD25^{hi} purificada de estos cultivos (paneles

inferiores). (C) Titulación de la función supresora de las células $CD25^{hi}$ aisladas en (B) a las relaciones $CD25^{hi}$: célula T indicadas. Los datos representan los valores medios \pm SD de proliferación por incorporación de 3H-Thy en cultivos por triplicado de células T $CD4^{+}$ activadas en un experimento representativo ($n=3$); **, $P < 0,01$. (D) Producción de IL-10 y TGF- β por ELISA en co-cultivos de timocitos L-DP $CD69^{hi}$ y MpDCs o McDCs como se describe en (A). Los datos representan los valores medios en pg/ml \pm SD de citoquinas producidas en cultivos por triplicado de un experimento representativo ($n=3$); *, $P < 0,05$ y **, $P < 0,01$. (E) Análisis de la capacidad supresora de las células $CD25^{hi}$ -pDC y $CD25^{hi}$ -cDC dependiente de IL-10 y TGF- β . El ensayo de supresión se realizó como se indica en (C) a una relación $CD25^{hi}$: célula T de 1:2 en presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes anti-IL10 (α IL-10) y anti-IL-10R (α IL-10R) o del inhibidor del TGF- β RI (T β RI). Como control negativo se utilizaron anticuerpos isotípicos irrelevantes (Ac C) o DMSO, respectivamente. Los datos representan los valores medios de inhibición de la proliferación de linfocitos T $CD4^{+}$ activados \pm SEM normalizados a los valores obtenidos en cultivos control de un experimento representativo realizado por triplicado, ($n=3$); **, $P < 0,01$.

4.2. La capacidad tolerogénica de MpDCs y McDCs es dependiente de la co-estimulación mediada por CD80/CD86.

Se ha descrito que los dos subtipos de células nTreg con producción diferencial de IL-10 o TGF- β residen en el timo humano y difieren en la expresión de la *molécula co-estimuladora inducible* ICOS ($ICOS^{+}$ y $ICOS^{-}$) (Ito et al., 2008). Como se muestra en la Figura 17, nuestros estudios *in vivo* mostraron dos poblaciones $ICOS^{lo}$ y $ICOS^{hi}$ dentro del compartimento de timocitos $CD4SP$ $CD25^{+}$, que podrían representar los dos subtipos previamente descritos.

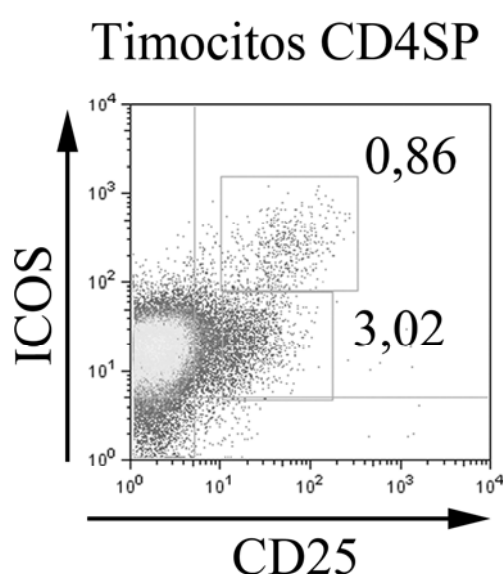


Figura 17. El timo humano contiene dos subtipos de células nTreg con diferente expresión de ICOS. Análisis por citometría de flujo de ICOS vs CD25 en timocitos $CD4SP$ aislados por separación magnética. Los números adyacentes a las regiones rectangulares indican los porcentajes de células positivas correspondientes. Los resultados mostrados pertenecen a un experimento representativo de tres ensayos independientes.

Por tanto, decidimos analizar si ICOS también se expresaba diferencialmente en los dos subtipos de células nTregs inducidas *in vitro* por pDCs y cDCs. Como se observa en la Figura 18A, los progenitores L-DP CD69^{hi} expresan bajos niveles de ICOS *in vivo* (IF: log 1-2), aunque ligeramente superiores a los observados en timocitos L-DP CD69^{lo} ($70,6 \pm 5,6\%$ vs $48,9 \pm 10,9\%$ ICOS⁺; MIF \pm SD: $11,9 \pm 1,3$ vs $6,8 \pm 1,4$, respectivamente). Sin embargo, ICOS se indujo en las células CD4⁺ CD25⁺ generadas en presencia de uno u otro subtipo de DCs (IF: log 2-3; Figura 18B), aunque los niveles de expresión eran ligeramente más elevados en las células derivadas en presencia de McDCs (MIF \pm SD: $35,7 \pm 6,4$ vs $26,9 \pm 3,3$ en nTregs-McDCs vs -MpDCs). Cuando se analizó la expresión del ligando de ICOS (ICOSL) en DCs intratímicas, encontramos que las pDCs y cDCs carecen de esta molécula *ex vivo* pero son capaces de inducir su expresión tras la maduración *in vitro* ($77,5 \pm 18,1\%$ vs $74,4 \pm 13,4\%$, en MpDCs y McDCs, respectivamente) (Figura 18C). Estos datos podrían sugerir la posible implicación de ICOS e ICOSL en la generación de nTregs intratímicas. Para estudiar esa posibilidad, analizamos el impacto del bloqueo de la interacción ICOS-ICOSL durante el proceso de diferenciación de los timocitos L-DP CD69^{hi} en nTregs.

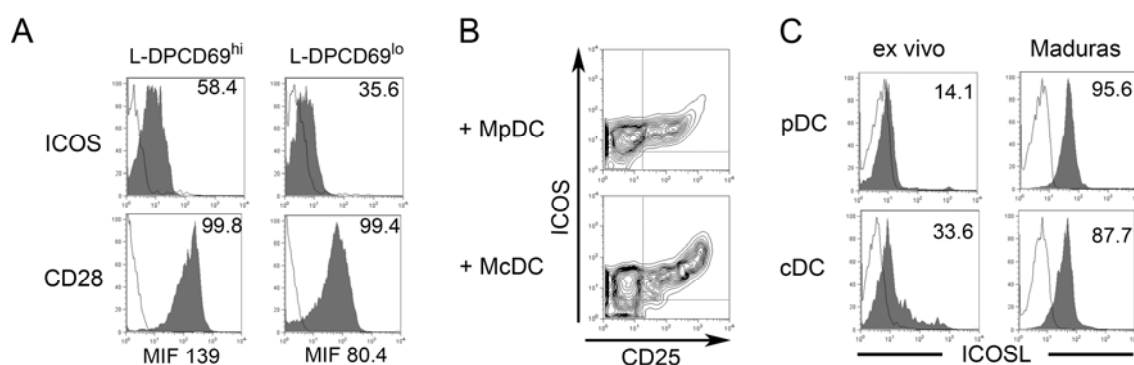


Figura 18. ICOS se induce durante la diferenciación de los timocitos L-DP en células nTreg e ICOSL se expresa en DCs intratímicas activadas. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de ICOS y CD28 en timocitos primarios L-DP CD69^{hi} y L-DP CD69^{lo}. Los números en los cuadrantes indican los porcentajes de células positivas. Las Medias de Intensidad de Fluorescencia (MIF) de CD28 se indican debajo. (B) Expresión de ICOS vs CD25 en nTregs derivadas de L-DP CD69^{hi} estimuladas con MpDCs o McDCs (C) Expresión de ICOSL en pDCs y cDCs intratímicas aisladas *ex vivo* o tras su maduración *in vitro*. Los números en los histogramas representan el porcentaje de células positivas. Los resultados mostrados proceden de un experimento representativo de tres ensayos independientes.

Como se observa en las Figuras 19A y 19B, la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-ICOSL no afectó significativamente la capacidad de MpDCs o McDCs de inducir la generación de células $CD25^+ Foxp3^+$, siendo ésta similar a la de cultivos control realizados en presencia de anticuerpos isotípicos irrelevantes. Sin embargo, experimentos similares utilizando anticuerpos anti-CD86 mostraron una reducción significativa de la generación de nTregs inducida en presencia de MpDCs o de McDCs (Figura 19A, 19B). Por el contrario, el bloqueo con anticuerpos anti-CD80 no tuvo un efecto significativo en la generación de nTregs, aunque su combinación con anti-CD86 produjo un efecto sinérgico llegando a inhibiciones cercanas al 80% (Figura 19A, 19B).

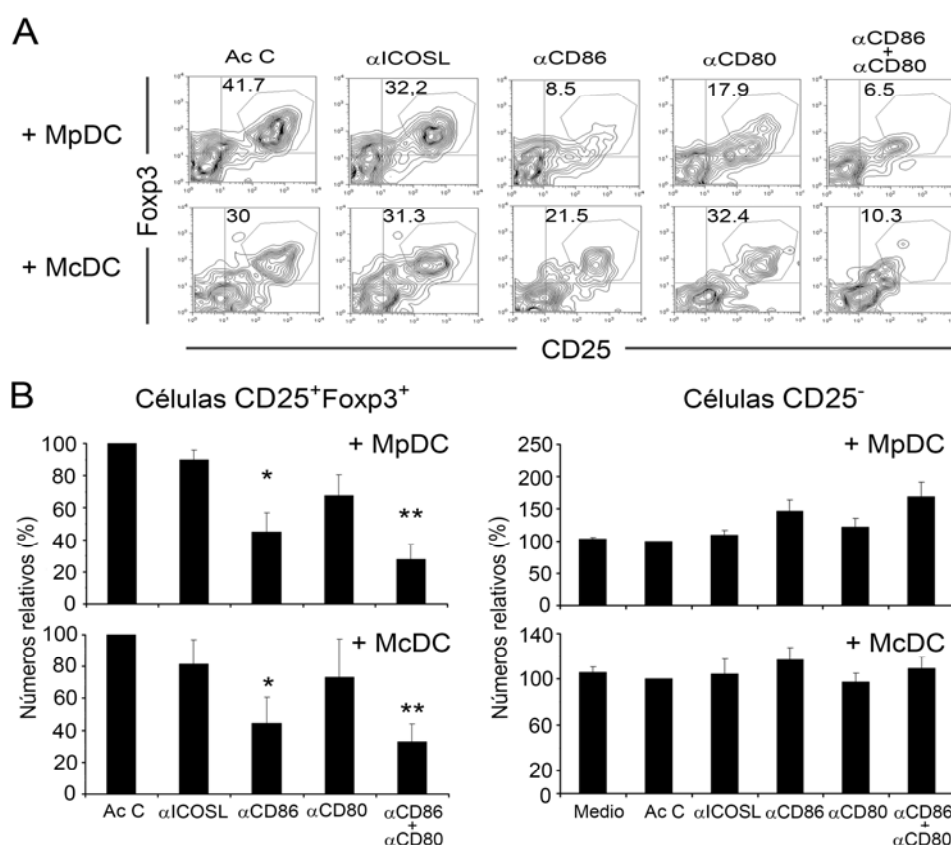


Figura 19. La capacidad de MpDCs y McDCs de inducir la diferenciación de nTregs a partir de timocitos L-DP $CD69^{hi}$ es dependiente de la función de los co-receptores CD80 y CD86. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de $CD25$ vs $Foxp3$ en la progenie de los timocitos L-DP $CD69^{hi}$ co-cultivados con MpDCs o McDCs, en presencia o ausencia de anticuerpos anti-ICOSL, -CD80, -CD86 o anti-CD86 + anti-CD80 durante 7 días. Los números representan el porcentaje de células $CD25^+ Foxp3^+$ de un experimento representativo ($n=3$) (B) Números relativos de células $CD25^+ Foxp3^+$ (izquierda) o $CD25^-$ (derecha) presentes en los cultivos descritos en (A). Los datos representan el valor medio \pm SEM de los números relativos normalizados a los valores obtenidos en cultivos control en presencia de anticuerpos isotípicos irrelevantes (Ac C) ($n=3$). *, $P < 0,05$ y **, $P < 0,01$.

El efecto de estos anticuerpos fue específico de la población de células nTreg, puesto que las células CD25⁻ presentes en los cultivos no se vieron afectadas (Figura 19B). Es de destacar que ambas poblaciones de timocitos L-DP CD69^{hi} y CD69^{lo} expresan CD28, el receptor de CD86/CD80, ($98,9 \pm 0,9\%$ y $95,4 \pm 3,9\%$, respectivamente) aunque a niveles más altos en los primeros (MFI: $134,5 \pm 4,5$ vs $60,5 \pm 19,9$, respectivamente; Figura 18A), lo que avala la relevancia fisiológica de esta vía. **En conclusión, nuestros datos sugieren la implicación funcional de la vía señalización de CD28-CD86/CD80, pero no de la vía de ICOS-ICOSL, en diferenciación de las células nTreg inducida por DCs.**

5. La activación a través del TCR induce la diferenciación de células nTreg mediante un mecanismo de retroalimentación dependiente de CD40L.

5.1. La activación de progenitores nTreg vía TCR induce la expresión de CD40L y produce la activación de pDCs autólogas.

Nuestros datos sugieren que, para poder ejercer su potencial tolerogénico *in vivo*, las pDCs deberían ser activadas en el timo. Además, nuestros datos habían mostrado que en el timo humano existe una población de células CD123⁺ CD13⁻ cuyo fenotipo se asemeja al de las pDCs activadas *in vitro* (Figura 8A, 8B), lo que sugería su activación *in situ*. Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue analizar las bases moleculares de la activación fisiológica de las pDCs en el timo, con el fin de entender los mecanismos que determinan la generación de Tregs *in vivo*. Considerando la relevancia de la vía CD40-CD40L en la activación de las pDCs, analizamos posibles poblaciones en el timo humano que pudieran expresar CD40L, prestando especial atención a la población de timocitos activados L-DP CD69^{hi}, ya que CD40L se induce tras la activación celular (Cayabyab et al., 1994; Fuleihan et al., 1995). Para ello, analizamos la expresión de CD40L a nivel transcripcional en diferentes estadios madurativos intratímicos DP y vimos que CD40L se transcribe exclusivamente en la población de timocitos L-DP CD69^{hi} (Figura 20A), aunque los niveles de expresión de la proteína en la membrana fueron indetectables. No obstante, la activación de estas células con anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 e IL-2 indujo la rápida (18-24h) expresión de CD40L en la fracción celular con niveles más elevados de CD69 ($9,7 \pm 4,2\%$) (Figura 20B), sugiriendo

que CD40L se induce selectivamente en timocitos L-DP CD69^{hi} que han sido activados a través de su TCR.

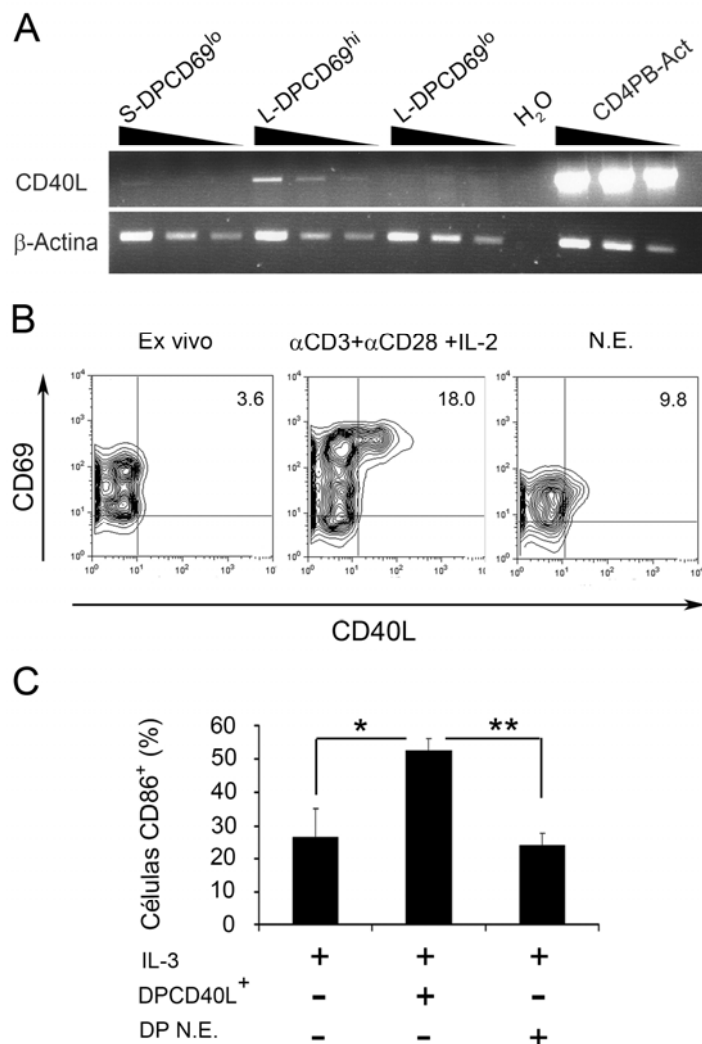


Figura 20. Los timocitos L-DP CD69^{hi} transcriben CD40L *in vivo* y lo expresan en la superficie tras la activación vía TCR, lo que los capacita para inducir la activación de pDCs autólogas. (A) Análisis por RT-PCR de la expresión de ARNm de CD40L en timocitos S-DP CD69^{lo}, L-DP CD69^{hi} y L-DP CD69^{lo} procedentes de un mismo individuo (panel superior). Como control positivo se utilizó el ADNc de linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica activados con PMA e ionomicina (CD4PB-Act). Se utilizaron diluciones seriadas de los ADNc de las muestras indicadas. (B) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD69 vs CD40L en timocitos L-DP CD69^{hi} primarios (izquierda) o tras la activación con anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 e IL-2 (centro) o en ausencia de estimulación (derecha; N.E., no estimulados). Los números mostrados en los cuadrantes indican los porcentajes de células positivas. (C) Números relativos de pDCs CD86⁺ tras 24h de cultivo con IL-3 en ausencia o presencia de timocitos L-DP CD69^{hi} estimulados (DPCD40L⁺) o no estimulados (DP N.E.) como se describe en (A). Los datos representan los valores medios \pm SD de 3 experimentos. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Estos datos sugerían la posibilidad de que los timocitos CD40L⁺ activados fueran capaces de inducir la activación de pDCs autólogas. Para analizar esta posibilidad, evaluamos la posible activación de pDCs en respuesta a células CD40L⁺. Como se muestra en la Figura 20C, se produjo un aumento significativo en la expresión de CD86 en las pDCs co-cultivadas con timocitos L-DP CD69^{hi} activados y suplementadas con IL-3 para mantener su supervivencia, en comparación con aquellas pDCs co-cultivadas con timocitos L-DP CD69^{hi} no activados e IL-3, o sólo cultivadas en presencia de IL-3. Por tanto, la maduración de las pDCs, al menos *in vitro*, se induce selectivamente por CD40L expresado en progenitores intratímicos activados. **Estos datos sugieren que la activación de los precursores de nTregs L-DP CD69^{hi} a través de su TCR autorreactivo podría llevar a la inducción de CD40L, que interaccionaría con CD40 en las pDCs intratímicas induciendo su maduración *in vivo* y “licenciándolas” para poder inducir la generación de nTregs.**

5.2. Las pDCs y las células nTreg co-localizan en la región medular del timo humano.

Nuestros datos sugieren que debe existir un diálogo entre pDCs y precursores de nTregs *in vivo*. Para estudiar esta posibilidad utilizamos técnicas inmunohistoquímicas en secciones de timo humano y tinciones con anticuerpos específicos anti-pDCs (anti-CD123) y anti-nTregs (anti-Foxp3), intentando determinar la existencia de interacciones entre ambos tipos celulares *in vivo*. En primer lugar definimos histológicamente las dos regiones intratímicas de médula (M) y corteza (C) mediante el uso de Topro-3, que tiñe específicamente el núcleo celular, y anticuerpos anti-pan citoqueratinas (Cytok), que definen patrones de expresión de citoqueratinas de distinta intensidad en las mTECs y cTECs. Como se observa en la Figura 21, esta tinción permite distinguir corteza y médula: la corteza se caracteriza por presentar mayor celularidad que la médula (mayor concentración de núcleos marcados con Topro), mientras que esta última presenta una mayor expresión de citoqueratinas (paneles superiores).

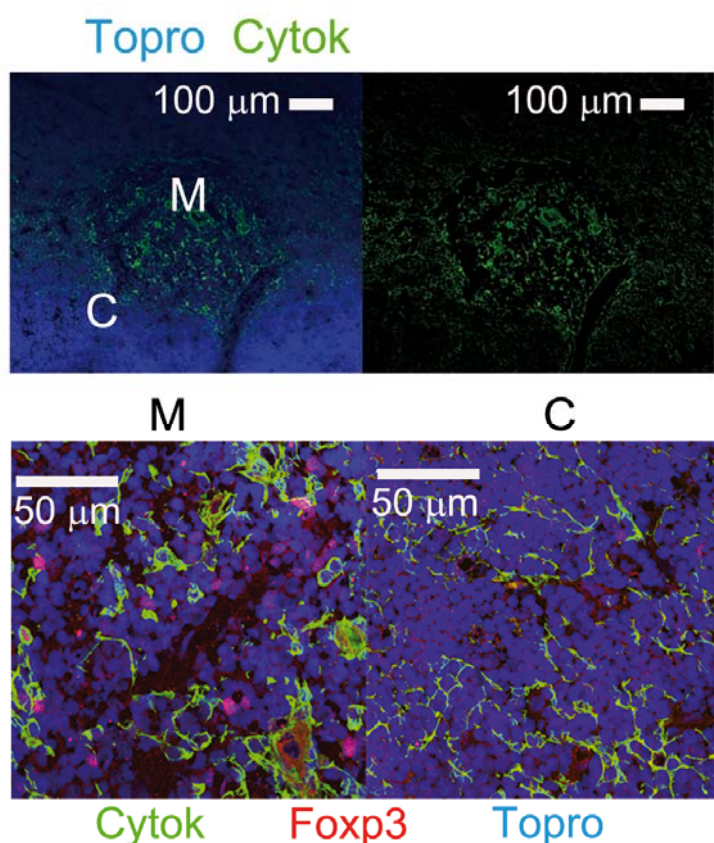


Figura 21. Las células Foxp3⁺ se localizan en la médula del timo humano. Secciones de timo humano mostrando la composición diferencial de corteza (C) y médula (M) en células epiteliales (Cytok, verde) y núcleos celulares (TOPRO-3, azul) (paneles superiores). La doble tinción de Cítok (verde) y Foxp3 (rojo) muestra la localización de células nTreg Foxp3⁺ en la médula tímica. (Paneles inferiores).

Para definir la localización de las células nTregs, realizamos tinciones dobles con anticuerpos anti-Foxp3. Observamos que, las células nTreg Foxp3⁺ se distribuyen selectivamente en la región medular (Figura 21, paneles inferiores). Finalmente, la tinción simultánea con anticuerpos anti-CD123 mostró la co-localización en la médula de células pDCs y nTreg (Figura 22A). Asimismo, identificamos contactos de pDCs y células Foxp3⁺ en el área medular, como se muestra en una ampliación de un campo representativo en la Figura 22B. La cuantificación de dichos contactos reveló que el $20,9 \pm 4,0$ % de las pDCs se encontraban contactando con células Foxp3⁺, mientras que un $7,7 \pm 1,7$ % de estas últimas interactuaban con las primeras (Figura 22C).

Estos resultados sugieren que, en condiciones fisiológicas, las pDCs medulares en el timo humano podrían interactuar con timocitos en desarrollo y regular su diferenciación en células nTregs.

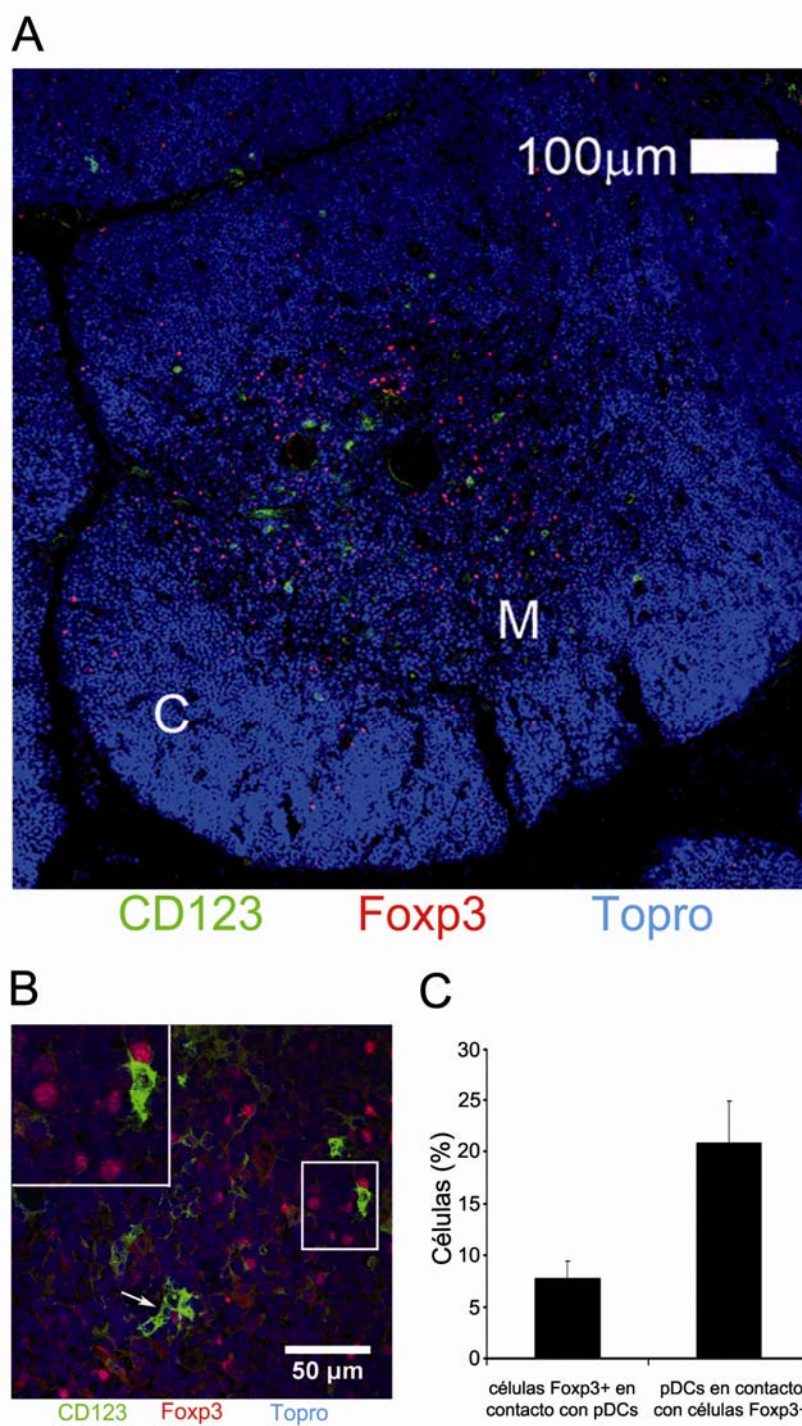


Figura 22. Las células nTreg Foxp3⁺ y las pDCs CD123⁺ co-localizan en la médula del timo humano donde establecen interacciones celulares. Doble tinción con anticuerpos anti-CD123 (verde) y anti-Foxp3 (rojo) mostrando la co-localización de pDCs y nTregs dentro de la médula tímica (A) y las interacciones entre ambas (B). (C) Cuantificación de los números relativos de células Foxp3⁺ interaccionando con pDCs CD123⁺, y viceversa. Los datos representan los valores medios \pm SEM obtenidos tras el conteo de 1464 células Foxp3⁺ y 518 pDCs en 7 campos de tres secciones de tejido independientes.

II. ORIGEN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS pDCs INTRATÍMICAS.

1. Los progenitores multipotenciales de timo humano (TLMP) generan pDCs y cDCs *in vitro*

Al menos parte de las pDCs intratímicas se generan *in situ* a partir de los progenitores TLMP linfo-mieloides que colonizan el timo. Experimentos *in vitro* de nuestro grupo demostraron hace tiempo que los progenitores TLMPs humanos son capaces de diferenciarse y generar cDCs simplemente en respuesta a IL-7 o a IL-7 en combinación con GM-CSF, IL-6 e IL-1 (Márquez et al, 1993; 1998), aunque estas condiciones de cultivo no inducían la generación de pDCs. Posteriormente, el grupo de Hergen Spits y Bianca Blom (Schotte et al, 2003; Fohrer et al, 2004) desarrolló un sistema experimental en co-cultivos con células estromales, que demostró el potencial pDC de los progenitores TLMPs. Sin embargo, cuál es el linaje celular de cada subtipo de DCs y qué relación existe entre las dos estirpes celulares durante su diferenciación en el timo, son preguntas que no se habían resuelto. Habiendo establecido la relevancia funcional de las DCs intratímicas, consideramos importante contestar a estas preguntas en el presente estudio. Para ello, en primer lugar analizamos el potencial de generación cDC y pDC de los TLMPs de timo humano en ensayos *in vitro*. Los progenitores TMLPs se seleccionaron en base a su elevada expresión del marcador CD34. Como se ha descrito previamente (García-Peydró et al., 2006), estas células presentaban un fenotipo CD44^{hi} CD1a⁻ CD33^{lo/+} (Figura 23).

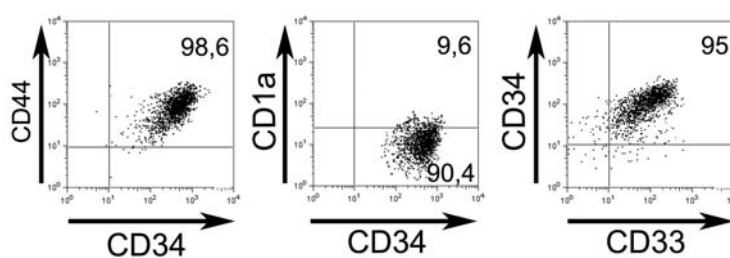


Figura 23. Fenotipo de progenitores multipotenciales TLMPs aislados de timo humano. Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD44, CD1a y CD33 en progenitores aislados de timo humano en base a sus elevados niveles de expresión de CD34. Los números representados en los cuadrantes indican el porcentaje de células positivas. Los datos representados corresponden a un experimento representativo (n>15).

Para analizar el potencial pDC de los TLMPs, utilizamos el sistema descrito por Spits y col. (Schotte et al., 2003) y cultivamos los progenitores TLMPs durante 12 días sobre una monocapa del estroma de MO de ratón OP9, en presencia de FLT3L e IL-7, dos citoquinas implicadas en la supervivencia y proliferación de los progenitores intratímicos (Schotte et al., 2003). En esas condiciones, se observó una expansión celular de $12,7 \pm 2,65$ veces \pm SEM a día 9 (Figura 24A) que se acompañó de la aparición de células CD123^{hi} CD13⁻ con niveles altos de expresión del marcador BDCA2, específico de pDCs (Dzionek et al., 2000) (Figura 24B). También se generaron células mieloides CD123^{lo} CD13^{hi} (Figura 24B) distintas de macrófagos, que no expresaban el marcador CD14 (Figura 24C). Esta población mostraba un fenotipo típico de cDCs CD33^{hi} CD11c⁺CD1a⁺ (Figura 24B). Ambos subtipos de DCs se generaron en los cultivos con cinéticas diferentes. Como se observa en la figura 24D, la generación de pDCs fue significativamente mayor que la de cDCs a día 7, tanto en términos relativos (gráfico superior) como absolutos (gráfico inferior). Sin embargo, a día 9 ambas poblaciones se habían generado con una eficiencia similar, aunque los porcentajes de cDCs aumentaron posteriormente, alcanzando valores cercanos al 40% a día 12, mientras que la frecuencia de pDCs disminuyó en cultivos tardíos (Figura 24D). En términos absolutos observamos resultados similares, siendo los números de células cDCs $4,59 \pm 1,7$ veces más elevados que los de pDCs a día 12 de cultivo (Figura 24D). Como reflejo de esta mayor eficiencia de generación de las cDCs respecto a las pDCs, sus números absolutos se incrementaron casi 40 veces de día 3 a día 12 de cultivo y sólo 8 veces en el caso de las pDCs ($38,2 \pm 12,14$ vs $8,3 \pm 2,26$ veces, respectivamente), sugiriendo una mayor capacidad de proliferación de las primeras.

Por tanto, los TLMPs son capaces de generar simultáneamente ambos subtipos de DCs, pDCs y cDCs, que difieren en sus cinéticas de generación y en su capacidad de expansión *in vitro*.

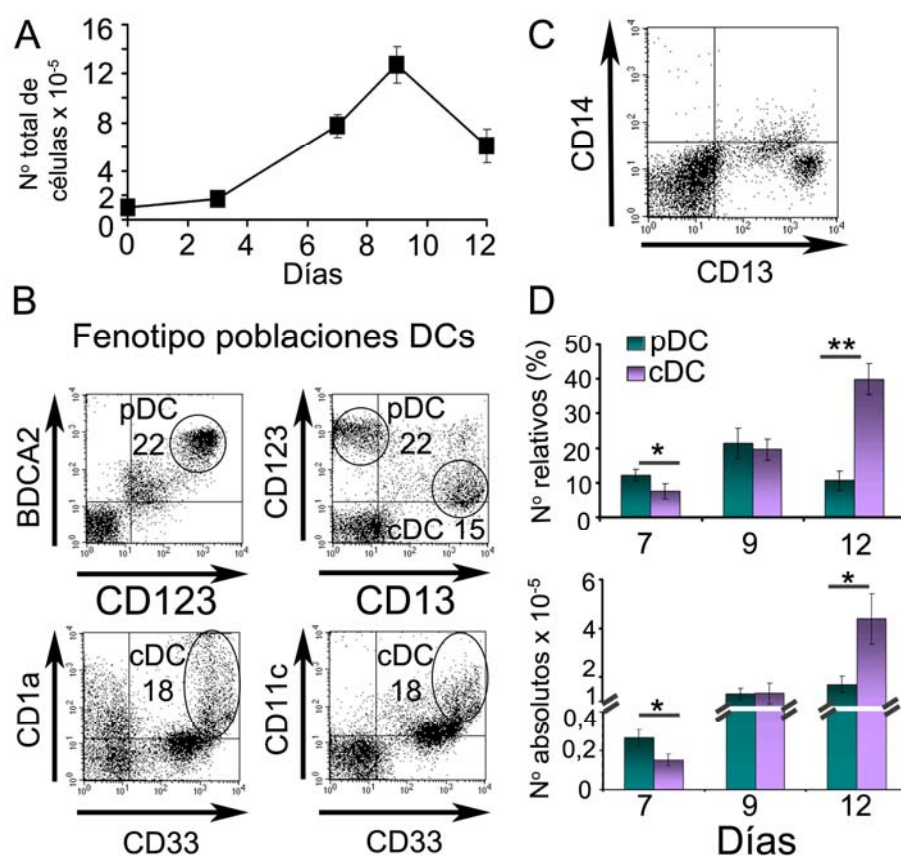


Figura 24. Los progenitores multipotenciales TLMPs de timo humano generan pDCs y cDCs *in vitro* con cinéticas diferentes. (A) Números totales de células recuperadas a día 3, 7, 9 y 12 en co-cultivos de TLMPs sobre OP9 y en presencia de FLT3L e IL-7. Los datos representados corresponden a la media del número de células \pm SEM de tres experimentos. Los datos fueron normalizados para 10^5 progenitores a día 0. (B) Análisis fenotípico de la expresión de BDCA2, CD123, CD13, CD1a, CD11c y CD33 en células procedentes de cultivos de día 9 realizados como se ha descrito en (A). Los números indican los porcentajes de células positivas incluidas en las regiones destacadas con elipses. Los datos corresponden a un experimento representativo (n=12) (C) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD14 vs CD13 a día 9 en un experimento representativo (n=12) realizado como se indica en (A). (D) Cinética de generación de pDCs (barras verdes) y cDCs (barras violetas) a partir de TLMPs cultivados en las condiciones descritas en (A). Los datos corresponden a la media de los porcentajes \pm SEM (gráfico superior) y números absolutos \pm SEM (gráfico inferior) de DCs generadas a día 7, día 9 y día 12 en 12 experimentos independientes. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

2. Las células pDCs y cDCs intratímicas comparten un progenitor intermediario mieloide CD34^{lo} CD5^{lo} CD123⁺.

2.1. La expresión diferencial del marcador de pDCs CD123 define dos tipos de progenitores intermediarios, de fenotipo linfoide o mieloide, derivados de los precursores multipotenciales TLMPs.

Nuestro grupo demostró hace unos años que los TLMPs generan cDCs a través de progenitores intratímicos CD34^{lo} CD5^{lo}, que mantienen potencial mieloide, pero han perdido la capacidad de generar linfocitos T (Márquez et al., 1998; de Yébenes et al. 2002). Sin embargo, se desconocía si las pDCs se generaban a partir de estos progenitores o, como sugería la literatura, a partir de un progenitor alternativo de origen linfoide. Con el objetivo de identificar el fenotipo de los progenitores intermediarios de las pDCs intratímicas, analizamos los cultivos de TLMPs a tiempos tempranos. Como se muestra en la Figura 25A, a día 3 de cultivo no se detectaron células pDC con fenotipo BDCA2⁺ CD123^{hi}, ni células cDC CD11c⁺ CD13^{hi}. Sin embargo, se identificaron dos poblaciones con una expresión opuesta del antígeno linfoide CD5 y del marcador de pDCs CD123: CD5^{hi} CD123⁻ (% ± SEM: 78,11 ± 1,88; Figura 25A, región I) y CD5^{lo} CD123⁺ (% ± SEM: 21,88 ± 1,8; Figura 25A, región II).

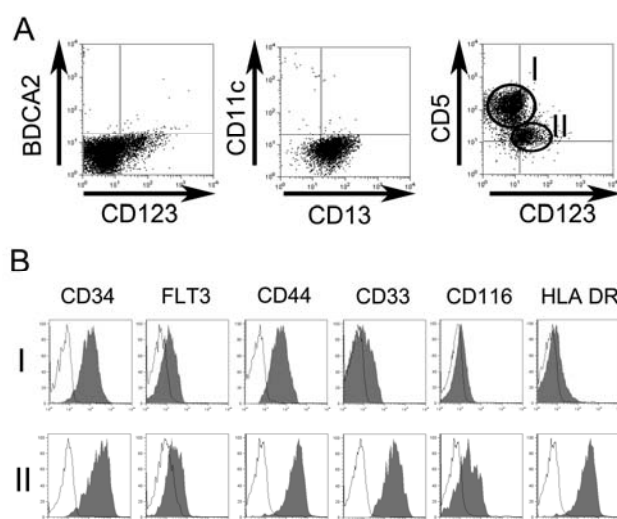


Figura 25. Los progenitores TLMPs de timo generan dos poblaciones de precursores intermediarios: linfoides CD5^{hi} CD123⁻ y mieloides CD5^{lo} CD123⁺. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de BDCA2 vs CD123, CD11c vs CD13 y CD5 vs CD123 en células derivadas de TLMPs humanos cultivados durante 3 días como se indica en la Figura 24A. (B) Análisis de la expresión de CD34, FLT3, CD44, CD33, CD116 y HLADR en las poblaciones I y II definidas en (A). Los datos corresponden a un experimento representativo (n=9).

Ambas poblaciones expresaban niveles intermedios-bajos de marcadores de progenitores como CD34 y FLT3 (Figura 25B), pero mostraban patrones inversos de expresión de marcadores asociados a los linajes linfoide o mieloide. Mientras que los progenitores $CD5^{lo} CD123^{+}$ tenían un fenotipo $CD44^{hi} CD33^{hi} CD116^{+} HLADR^{+}$, idéntico al descrito para los progenitores intermediarios mieloides de las cDC (Márquez et al., 1998; de Yébenes et al., 2002), los precursores $CD5^{hi} CD123^{-}$ eran células $CD44^{lo} CD33^{lo/-} CD116^{-} HLADR^{-/lo}$, con un fenotipo típico de progenitores linfoides T/NK (Márquez et al., 1995 y 1998; de Yébenes et al., 2002) (Figura 25B).

Por tanto, la expresión de CD123 parece definir dos tipos independientes de progenitores intermediarios, con fenotipo linfoide o mieloide, derivados de los progenitores multipotenciales TLMPs.

2.2. Patrones de expresión génica de los progenitores intermediarios $CD5^{lo} CD123^{+}$ y $CD5^{hi} CD123^{-}$ derivados de TMLPs: expresión selectiva de genes asociados al linaje mieloide y a DCs en los progenitores $CD5^{lo} CD123^{+}$.

Para establecer a nivel genético la relación de los progenitores intermediarios identificados con las estirpes linfoide o mieloide, analizamos seguidamente sus patrones de expresión génica por macroarrays, utilizando tarjetas microfluídicas (ver Materiales y Métodos, apartado 5.2) que incluían 96 genes, entre ellos genes asociados a las estirpes mieloide o linfoide y al linaje de DCs. Para ello, aislamos por FACS los progenitores $CD5^{lo} CD123^{+}$ ($CD123^{+p}$) y $CD5^{hi} CD123^{-}$ ($CD5^{+p}$) generados *in vitro* (Figura 26A) y comparamos sus perfiles de expresión con los de sus precursores TLMPs primarios. Simultáneamente, analizamos las poblaciones de pDCs y cDCs primarias aisladas de timo humano, tratando de obtener información genética sobre sus linajes celulares. En la Tabla 4 se muestran los valores relativos de expresión de los genes que encontramos expresados diferencialmente en progenitores mieloides $CD123^{+p}$ y linfoides $CD5^{+p}$.

Genes	CD5 ⁺ p	CD123 ⁺ p
<i>BMP4</i>	1	25,34
<i>DLL1</i>	1	4,5
<i>DLL4</i>	1	0,48
<i>DELTEX1</i>	1	3,68
<i>EBF1</i>	1	0,54

Genes	CD5 ⁺ p	CD123 ⁺ p
<i>EGR3</i>	1	27,14
<i>ETS1</i>	1	0,13
<i>FOS</i>	1	8,6
<i>GATA2</i>	1	6,5
<i>GATA3</i>	1	0,09

<i>GFI1B</i>	1	4,7
<i>GLI1</i>	1	0,52
<i>GLI2</i>	1	67
<i>GLI3</i>	1	0,06
<i>HES1</i>	1	0,04
<i>HOXA9</i>	1	7,76
<i>HOXB4</i>	1	0,71
<i>ID2</i>	1	2,83
<i>ID3</i>	1	20
<i>IKZF2(Helios)</i>	1	0,26
<i>IKZF3(Aiolos)</i>	1	0,04
<i>IRF4</i>	1	7,5
<i>IRF8</i>	1	29,4
<i>JAG1</i>	1	65
<i>JAG2</i>	1	0,49
<i>LEF1</i>	1	0,2
<i>LMO2</i>	1	71,3
<i>MYB1</i>	1	0,65
<i>MYC</i>	1	2,9

<i>NFKB1</i>	1	2,7
<i>NFKB2</i>	1	2,9
<i>NOTCH1</i>	1	0,66
<i>NOTCH2</i>	1	2,11
<i>NOTCH3</i>	1	7,25
<i>NOTCH4</i>	1	98,2
<i>PAX5</i>	1	94,5
<i>pTα</i>	1	0,02
<i>RAG1</i>	1	0,007
<i>RAG2</i>	1	0,03
<i>RELB</i>	1	3,2
<i>RUNX1</i>	1	0,66
<i>RUNX3</i>	1	3,9
<i>SMO</i>	1	0,66
<i>SNAIL</i>	1	3,74
<i>SPI1(PU.1)</i>	1	14,5
<i>SPIB</i>	1	63,7
<i>TCF12(HEB)</i>	1	0,34
<i>TCFL5</i>	1	0,51

Tabla 4. Genes expresados diferencialmente en las poblaciones de progenitores intermediarios CD123⁺p y CD5⁺p. Los valores se normalizaron a los obtenidos para los progenitores CD5⁺p.

El análisis comparativo de la expresión de estos genes en los progenitores intermediarios y en sus precursores TLMPs mostró diferencias importantes en genes relevantes que se resumen en la Figura 26B. Los progenitores CD5⁺p mostraron niveles de expresión similares o ligeramente incrementados, en relación a los TLMPs, de los genes linfoides *RAG1* y *RAG2* (Oettinger et al., 1990; Ramiro et al, 1996) y de los factores de transcripción *GATA3* (Ho et al., 1991; Hosoya et al, 2009.), *ID3* (Lauritsen et al., 2009) y *ETS1* (Bhat et al., 1989), que se expresaban a bajos niveles en los progenitores CD123⁺p. Conforme a su fenotipo linfoide, los progenitores CD5⁺p mostraron también una disminución significativa de factores de transcripción que se han asociado específicamente a linajes mieloides, así como al desarrollo de pDCs y cDCs, tales como *GATA2* (Rodrigues et al., 2008), *PU.1* (Anderson et al., 2000; Carotta et al., 2010), *SPIB* (Schotte et al., 2004), *IRF8* (Tsujimura et al., 2003) e *IRF4* (Tamura et al., 2005). Por el contrario, la expresión de estos últimos, se mantenía sin cambios o se incrementaba significativamente en los progenitores de fenotipo mieloides CD123⁺p y en las DCs intratímicas.

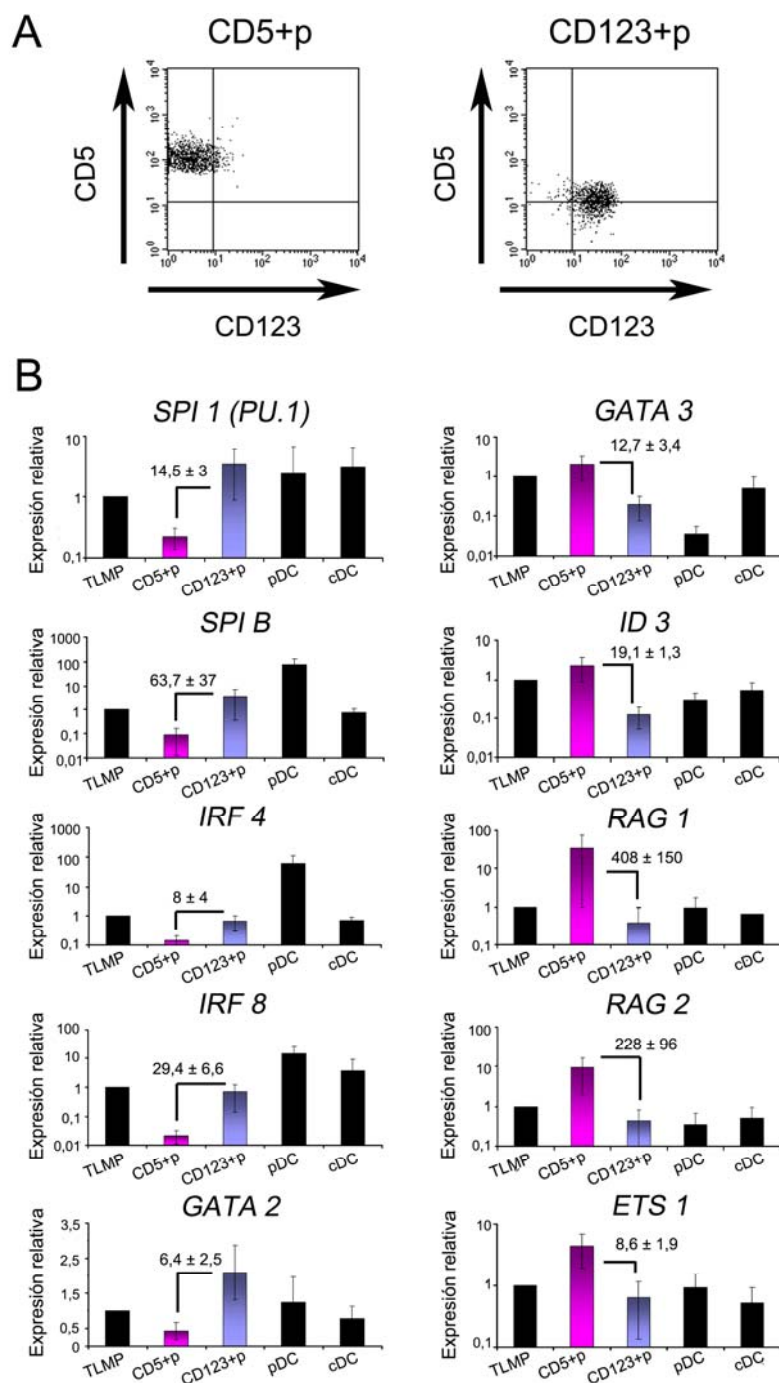


Figura 26. Los progenitores $CD5^{lo} CD123^{+}$ y $CD5^{hi} CD123^{-}$ presentan diferentes patrones de expresión de genes asociados a las estirpes linfóide y mieloide y al linaje de DCs. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD5 vs CD123 en las poblaciones de progenitores derivados de TLMPs y seleccionadas por FACS como $CD5^{hi} CD123^{-}$ ($CD5^{+}p$) y $CD5^{lo} CD123^{+}$ ($CD123^{+}p$) tras tres días de co-cultivo sobre células OP9, en presencia de FLT3 e IL-7. Los datos corresponden a un experimento representativo ($n=8$). (B) Análisis por Q-PCR de la expresión de los genes indicados en los progenitores $CD5^{+}p$ y $CD123^{+}p$ descritos en (A) y en poblaciones de células primarias intratímicas TLMPs, pDCs y cDCs. Los datos se normalizaron para los valores correspondientes a la población de TLMPs ($n=3$). Los números indican la diferencia de expresión (número de veces \pm SEM) entre células $CD123^{+}p$ y $CD5^{+}p$ de los genes indicados.

En conjunto, nuestros resultados indican que los progenitores intermediarios CD123⁺, derivados de los precursores intratímicos TLMPs, presentan características fenotípicas y genotípicas mieloides y expresan genes asociados a DCs. Por el contrario, los progenitores CD5⁺ presentan marcadores moleculares y genéticos de células linfoides. Por tanto, basándonos en criterios fenotípicos y genotípicos, podemos concluir que los progenitores CD123⁺ y CD5⁺ (o CD123⁻) se pueden adscribir diferencialmente a las estirpes mieloide y linfoide, respectivamente.

2.3. *Los progenitores de las pDCs intratímicas residen específicamente en la población de precursores intermediarios mieloides CD5^{lo} CD123⁺.*

Los datos presentados indican que las pDCs derivadas de los precursores TLMPs debían generarse a través de una de las dos poblaciones de progenitores intermediarios mieloides o linfoides identificados *in vitro*. Para determinar el potencial pDC de estos progenitores, ambos se aislaron por FACS a día 3 de cultivo (Figura 26A) y se cultivaron independientemente durante 10 días adicionales en el co-cultivo OP9. Conforme a su condición mieloide, los progenitores CD123⁺p generaron eficientemente células cDCs con fenotipo mieloide CD13⁺, que también expresaban CD123 (Figura 27A). Sorprendentemente, estos progenitores generaron simultáneamente una población de células pDCs CD13⁻ CD123⁺ (Figura 27A). Como observamos en los cultivos de TLMPs (Figura 24), las cinéticas de generación de ambos tipos de DCs fueron distintas (Figura 27A, derecha) y, de nuevo, la recuperación de cDCs fue significativamente mayor que la de pDCs a tiempos largos (Figura 27B). Por el contrario, los progenitores CD5⁺p fueron incapaces de generar ninguno de los subtipos de DCs, pero dieron lugar a células linfoides CD5⁺ CD7⁺ con fenotipo de células pre-T CD3⁻ TCRαβ⁻, que incluían células en los estadios madurativos CD4ISP y CD8⁺ CD4⁺ DP (Figura 27C). Por tanto, los progenitores intermediarios CD123⁺p y CD5⁺p analizados en este estudio definen dos vías de diferenciación intratímica independientes, que dan lugar respectivamente a DCs o a linfocitos T.

En conclusión, nuestros datos indican que los progenitores CD123⁺p representan precursores intratímicos mieloides comunes para los dos subtipos de DCs, que se han separado de la ruta de diferenciación intratímica mayoritaria y han perdido el potencial de generar linfocitos T.

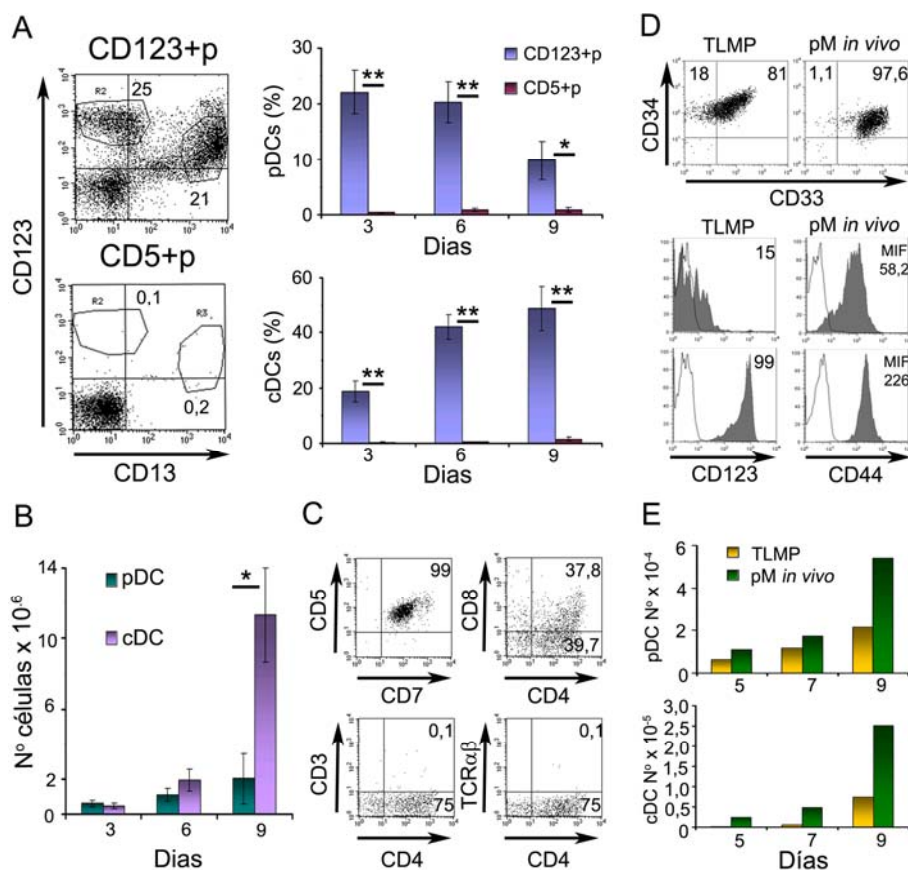


Figura 27. Las pDCs y cDCs se originan simultáneamente a partir de TLMPs a través de progenitores intermediarios mieloides CD5^{lo} CD123⁺ incluidos *in vivo* en la población de timocitos CD34^{lo} CD33⁺. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD123 vs CD13 en la progenie derivada a día 7 de cultivo de progenitores intermediarios CD123⁺p o CD5⁺p aislados por FACS a partir de cultivos de 3 días de TLMPs (izquierda). En la derecha se muestran los números relativos de pDCs (gráfico superior) y cDCs (gráfico inferior) generadas en cultivos de CD123⁺p o CD5⁺p, respectivamente, a diferentes días de cultivo. Los datos representan los valores medios \pm SEM obtenidos en 8 experimentos independientes. ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$. (B) Números absolutos de pDCs y cDCs generadas a partir de CD123⁺p. Los datos representan los valores medios \pm SEM de 8 experimentos independientes. * $P < 0,05$ (C) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD5 vs CD7; CD8 vs CD4; CD3 vs CD4 y TCR $\alpha\beta$ vs CD4 en cultivos de CD5⁺p a día 9. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo (n=8). (D) Expresión de CD34 vs CD33 en TLMPs y progenitores mieloides (pM) residentes *in vivo* en el timo humano tras su aislamiento por FACS (histogramas superiores). Los números representan el porcentaje de células positivas. En los histogramas inferiores se representa la expresión *in vivo* de CD123 y CD44 en TLMPs y pMs. Los números indican el porcentaje de células CD123⁺ (izquierda) y la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de la expresión de CD44 en las poblaciones citadas (derecha). (E) Números absolutos de células pDCs (gráfico superior) y cDCs (gráfico inferior) generadas *in vitro* a partir de TLMPs y pMs a días 5, 7 y 9 de cultivo. Los datos corresponden a un experimento representativo.

Para corroborar nuestra hipótesis, analizamos seguidamente la posible existencia *in vivo* de una población CD123⁺p en el timo humano. Específicamente, estudiamos la expresión de CD123 en la población intratímica de progenitores con fenotipo mieloides

CD34^{lo} CD33^{hi} y alta expresión de CD44 (pM *in vivo*) que había sido caracterizada previamente por nuestro grupo por su potencial cDC (Márquez et al., 1993; de Yébenes et al., 2002). Los resultados que se muestran en la Figura 27D indican que la totalidad de los precursores pM CD34^{lo} CD33^{hi} expresan altos niveles de CD123 y, por tanto, serían el equivalente *in vivo* de la población de progenitores con potencial pDCs y cDCs identificada *in vitro*. Para confirmar su relevancia fisiológica, realizamos estudios funcionales con los progenitores primarios CD34^{hi} CD33^{lo} aislados de timo humano (Figura 27D), que corroboraron su capacidad de generar pDCs y cDCs *in vitro* (Figura 27E). Como cabría esperar de progenitores intermediarios, estos precursores fueron más rápidos y eficientes que los TLMPs en la generación de ambos linajes de DCs.

Por tanto, nuestros datos indican que las pDCs intratímicas, al igual que las cDCs, se generan a partir de los precursores multipotenciales intratímicos TLMPs siguiendo una ruta de diferenciación no-T, a través de progenitores intermediarios mieloides CD34^{lo} CD33⁺ CD123⁺.

2.4. Los progenitores mieloides CD123⁺p y linfoides CD5⁺p generan células NK en respuesta a diferentes citoquinas.

Los progenitores TLMPs intratímicos poseen la capacidad de generar células NK (Lanier et al., 1992; Michon et al., 1988) que, al menos en ratón, parecen constituir un tipo celular distinto a las células NK periféricas (Di Santo y Vosshenrich, 2006). Tanto en humanos como en ratón, las células NK intratímicas se generan eficientemente en respuesta a IL-2 o IL-15 a partir de progenitores bipotenciales T/NK (Leclercq et al, 1996), que en humanos se incluyen en la población de precursores intermediarios linfoides CD5⁺ CD33⁻ (Márquez et al., 1998; Sánchez et al., 1994). Sin embargo, estudios previos de nuestro grupo demostraron que las células NK se diferencian asimismo a partir de precursores intermediarios mieloides CD5⁻ CD33⁺, que generan también DCs en ensayos clonales en respuesta a IL-2 (Márquez et al., 1998; de Yébenes et al., 2002). Existe por tanto la posibilidad de que los dos tipos de células NK identificadas representen dos subtipos NK con un origen independiente y distintos requerimientos para su generación. Confirmando esta posibilidad, observamos que cuando los progenitores CD123⁺p mieloides identificados en este estudio se co-cultivaron con células OP9 en presencia de FLT3L e IL7 generaron, no sólo pDCs y cDCs, sino también células NK de fenotipo CD56⁺ CD33⁻ (Figura 28A). Estas

células NK se generaban con eficiencias similares y cinéticas paralelas a las de las células cDCs. Por el contrario, los progenitores linfoides CD5⁺p no mostraron potencial NK en estas condiciones de cultivo, pero generaron células NK en presencia de IL-2 (Figura 28B). Cabe destacar que la IL-2 incrementó significativamente la eficiencia de generación de células NK a partir de los progenitores mieloides ($25 \pm 8,8$ veces; Figura 28B).

Análisis fenotípicos mostraron patrones de expresión similares en las células NK procedentes de precursores CD123⁺p o CD5⁺p, con bajos niveles del antígeno CD16 y una expresión mayoritaria de receptores CD94 y NKG2A (Figura 28C) y ausencia de receptores KIR (datos no mostrados). Por tanto, ambos progenitores intermediarios, mieloides y linfoides, dan lugar a células NK con un fenotipo CD16^{lo/-} CD94⁺ NKG2A⁺ equivalente al descrito para células NK intratímicas en ratón (Vosshenrich et al., 2006).

En conclusión, nuestros datos demuestran que los progenitores CD123⁺p mieloides y CD5⁺p linfoides retienen la capacidad de generar dos tipos de células NK, fenotípicamente idénticas, aunque con diferente dependencia de IL-2.

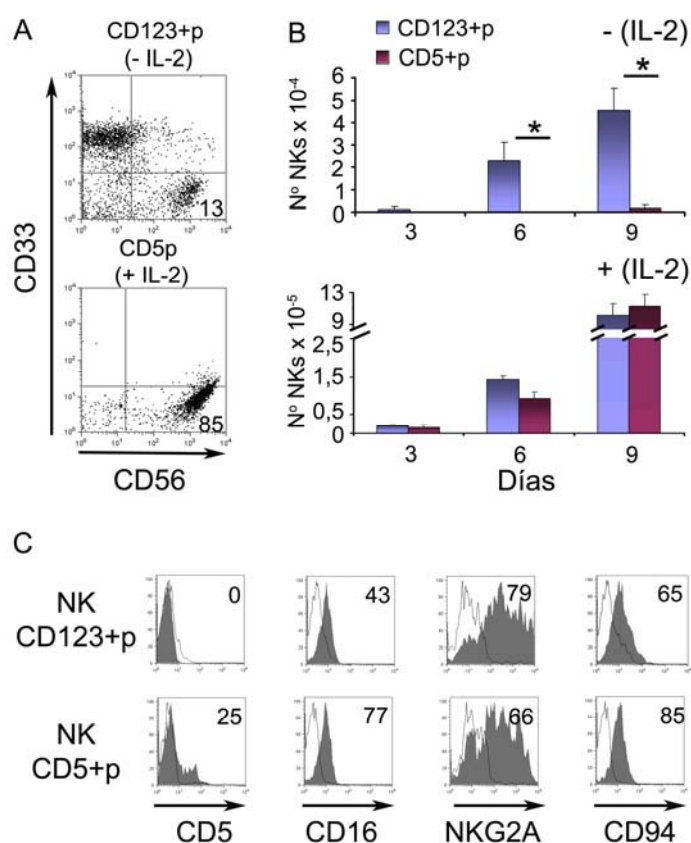


Figura 28. Los progenitores CD123⁺p y CD5⁺p generan células NK en respuesta a diferentes citoquinas. (A) Análisis de la expresión de CD33 vs CD56 en células generadas a partir de progenitores CD123⁺p cultivados con IL-7 y FLT3 en ausencia de IL-2 (histograma superior) y en cultivos de CD5⁺p suplementados con IL-2 (histograma inferior) durante 9 días. Los números representan el porcentaje de células positivas. (B) Números absolutos de células NK CD56⁺ CD33⁻ generados a partir de progenitores CD123⁺p o CD5⁺p en ausencia (histograma superior) o presencia (histograma inferior) de IL-2 a diferentes días de cultivo. Los datos representan los valores medios \pm SEM obtenidos en 3 experimentos. *, $P < 0,05$. (C) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD5, CD16, NKG2A y CD94 en células NK generadas a partir de progenitores CD123⁺p (panel superior) o CD5⁺p (panel inferior) en presencia de IL-2 en un experimento representativo (n=3).

3. Implicación de la vía de señalización de Notch en el desarrollo de las DCs intratímicas humanas. Papel diferencial de los ligandos *DLL1* y *JAG1*.

3.1. Los progenitores mieloides CD123⁺p expresan un patrón específico de receptores Notch y su generación está diferencialmente regulada por DLL1 y JAG1.

La información disponible sobre la participación de Notch en la diferenciación de las DCs es bastante controvertida, probablemente debido al origen diverso de los progenitores estudiados y a la variedad de ligandos y receptores Notch analizados en distintos sistemas experimentales (Olivier et al., 2006; Dontje et al., 2006; Caton et al., 2007; Zhou et al., 2007; Cheng et al., 2007). En el caso de las DCs intratímicas, su diferenciación *in situ* a partir de los precursores TLMPs podría estar sujeta a una regulación espacio-temporal mediada por Notch, a través de su interacción con ligandos específicos distribuidos diferencialmente en distintas localizaciones intratímicas (Lehar et al., 2005; García-León et al., manuscrito en preparación). Por tanto, quisimos analizar la función de distintos ligandos de Notch en estadios sucesivos del proceso de diferenciación de los dos subtipos de DCs intratímicas.

Para ello, estudiamos en primer lugar la funcionalidad de la vía de Notch *in vivo* y analizamos por Q-PCR la distribución de los receptores Notch 1, 2, 3 y 4 en las pDCs y cDCs residentes en el timo humano, en relación a los progenitores multipotenciales TLMPs, así como en los progenitores CD123⁺p mieloides y CD5⁺p linfoides derivados *in vitro* de éstos. Como se muestra en la Figura 29A, detectamos niveles similares de ARNm de Notch 1 y 2 en progenitores CD123⁺p y CD5⁺p. Sin embargo, Notch 3 se expresaba más eficientemente en precursores linfoides CD5⁺p, mientras que los niveles de Notch 4 eran significativamente mayores en los progenitores mieloides CD123⁺p. Los TLMPs transcribían con similar eficiencia los genes que codifican para los cuatro miembros de la familia Notch. Asimismo, los cuatro receptores Notch se expresaban *in vivo* en las pDCs y cDCs intratímicas, aunque Notch1 estaba significativamente disminuido y Notch4 incrementado en células pDC (Figura 29A). **Por tanto, los progenitores CD123⁺p y su progenie de pDCs y cDCs expresan receptores Notch con un patrón específico que difiere del observado en precursores linfoides CD5⁺p.**

Nuestro siguiente objetivo fue establecer la relevancia funcional de distintos ligandos de Notch en la generación de los progenitores CD123⁺p a partir de los TLMPs que colonizan el timo humano, para lo cual analizamos comparativamente las dos familias de ligandos de

Notch, *Delta-like* y *Jagged*. Con este objetivo, utilizamos sistemas de co-cultivo con células estromales OP9, en las que expresamos independientemente los ligandos DLL1 o JAG1 por transducción con vectores retrovirales bicistrónicos portadores de GFP. Como control negativo, se utilizaron células OP9 transducidas con los vectores-GFP vacíos (GFP-MigR1 y GFP-pLRZS, respectivamente). La funcionalidad de las líneas estromales generadas se comprobó en co-cultivos con progenitores linfoides CD5⁺p (Figura 29B), que demostraron la eficiente y selectiva proliferación de estos precursores y su diferenciación en linfocitos pre-T IL-7R⁺ tras su interacción con DLL1 o JAG1 como se ha descrito (García-Peydró et al., 2006; González-García et al., 2009). Utilizando estas líneas estromales, analizamos la generación de los progenitores de DCs CD123⁺p en co-cultivos con TLMPs (Figura 29C). Estos ensayos confirmaron el efecto inhibitorio de DLL1 (García-Peydró et al., 2006). Por el contrario, JAG1 permitió la generación de progenitores mieloides CD123⁺p a partir de TLMPs.

En conclusión, DLL1 y JAG1 regulan diferencialmente la generación de progenitores mieloides CD123⁺p a partir de los precursores multipotenciales TMLPs, siendo DLL1 inhibitorio y JAG1 permisivo.

3.2. Ambos ligandos de Notch, DLL1 y JAG1, promueven la supervivencia de los progenitores inmediatos CD123⁺p de las DCs.

Los datos obtenidos sugieren que los progenitores inmediatos de las DCs podrían generarse selectivamente *in vivo* a partir de TMLPs en las localizaciones intratímicas JAG1⁺. Puesto que estos precursores CD123⁺p existen en efecto *in vivo*, cabe preguntarse cuál es el impacto de Notch y sus ligandos sobre su potencial DC una vez han sido generados. Para responder a esta cuestión, obtuvimos progenitores CD123⁺p a partir de TLMPs, los aislamos por FACS y analizamos su potencial de diferenciación en co-cultivos sobre OP9-DLL1 u OP9-JAG1. En ambas condiciones, observamos una recuperación celular significativamente mayor a la observada en cultivos control con OP9-GFP, especialmente a día 10 ($3,13 \pm 0,13$ y $1,7 \pm 0,23$ veces mayor en OP9-DLL1 y OP9-JAG1, respectivamente), aunque DLL1 fue consistentemente más eficiente que JAG1 promoviendo este efecto (Figura 30A). Estos datos son compatibles con dos funciones alternativas o simultáneas de Notch sobre los progenitores CD123⁺p: 1) la inducción de su supervivencia y/o proliferación y 2) la inducción de su diferenciación y de la expansión de su progenie.

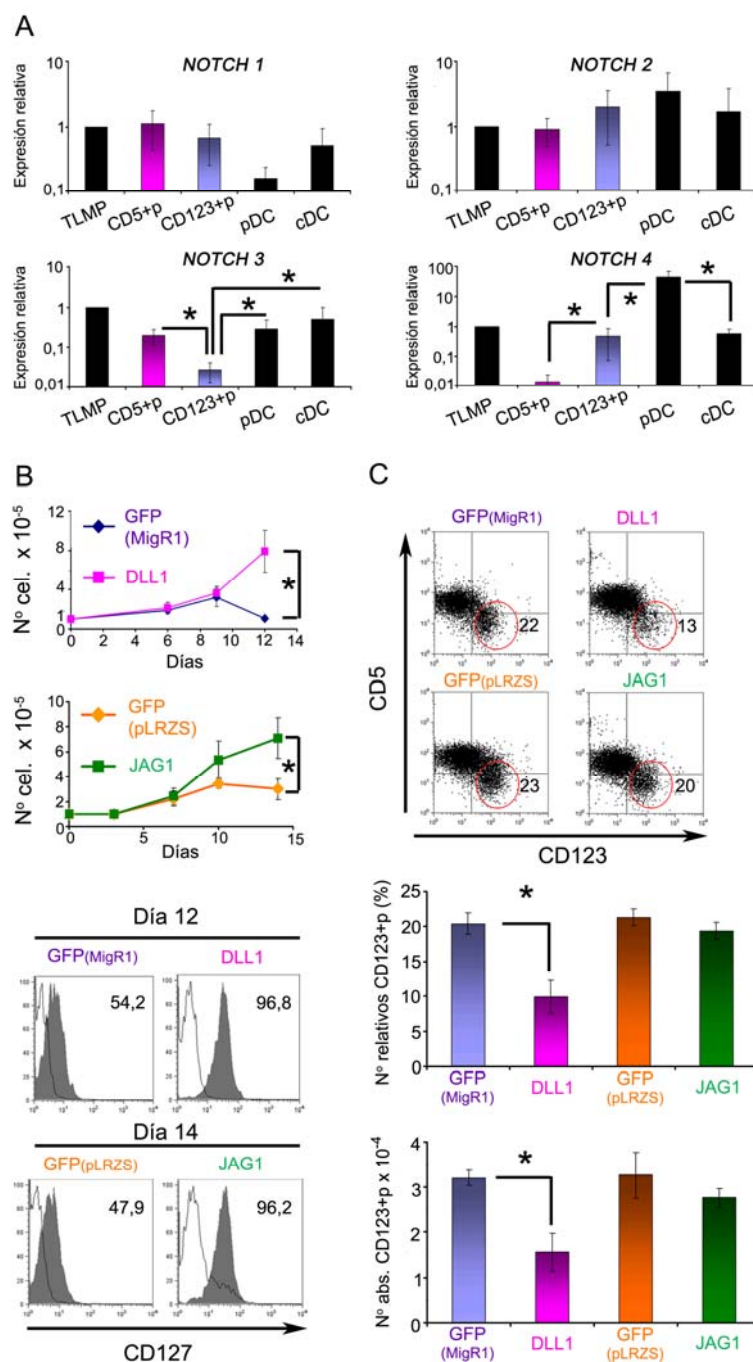


Figura 29. Los progenitores CD123⁺p poseen un patrón específico de expresión de receptores Notch y su generación está diferencialmente regulada por DLL1 y JAG1. (A) Análisis de la expresión transcripcional de NOTCH 1, 2, 3 y 4 por Q-PCR en progenitores CD123⁺p y CD5⁺p generados *in vitro* y en TLMPs, cDCs y pDCs aislados *ex vivo*. Los valores se normalizaron respecto a los obtenidos para TLMPs. Los datos representan los valores medios \pm SEM de 3 experimentos. *; $P < 0,05$. (B) Números totales (parte superior) y fenotipo (parte inferior) de las células generadas *in vitro* a partir de progenitores CD5⁺p co-cultivados con células OP9-DLL1, OP9-JAG1 y controles

OP9-GFP. En las gráficas superiores se representan los valores medios \pm SEM de 3 experimentos. *; $P < 0,05$. En los histogramas inferiores se representa la expresión del IL-7R α (CD127, histograma sombreado) a días 12 y 14 de cultivo en relación a la tinción inespecífica con anticuerpos isotípicos irrelevantes (histogramas vacíos). Los números corresponden al porcentaje de células positivas de un experimento representativo (n=3). (C) Generación de progenitores intermediarios mieloides CD123⁺p y linfoides CD5⁺p a partir de TLMPS cultivados por 3 días en presencia o ausencia de DLL1 o JAG1. El panel superior muestra el análisis por citometría de flujo de la expresión de CD5 vs CD123 en las células generadas. Los números corresponden al porcentaje de células positivas en las regiones indicadas. Los números relativos y absolutos de los progenitores mieloides CD123⁺p generados se representan en los paneles medio e inferior, respectivamente. Los datos corresponden a los valores medios \pm SEM de 3 experimentos independientes. *; $P < 0,05$.

Para discernir entre ambas posibilidades, analizamos en primer lugar la capacidad de expansión de la población CD123⁺p, caracterizada por el fenotipo CD123⁺ CD13^{lo} (Figura 30B), en respuesta a los ligandos de Notch. Como se observa en la Figura 30C, ambos ligandos, DLL1 y JAG1, incrementaron significativamente los números absolutos de estos progenitores a día 7 de cultivo, con respecto a sus controles ($3,5 \pm 1,12$ y $1,7 \pm 0,2$ veces, respectivamente); aunque el efecto de DLL1 fue superior al de JAG1 y se observó a lo largo de todo el cultivo. Para analizar directamente la capacidad de proliferación de los progenitores CD123⁺p realizamos estudios por marcaje con CFSE (Figura 30D). Observamos un ligero incremento en la proliferación celular de los progenitores en presencia de ambos ligandos de Notch, aunque este incremento fue menor del esperado teniendo en cuenta los elevados números absolutos recuperados (Figura 30A). Para explicar esta aparente discrepancia, analizamos la viabilidad de los progenitores CD123⁺ CD13^{lo} a lo largo del cultivo. Como se muestra en la Figura 30E, se observó un porcentaje considerable de células apoptóticas Anexina V⁺ en los cultivos control, que se redujo significativamente en ambos co-cultivos OP9-DLL1 y OP9-JAG1, en presencia de los ligandos de Notch. Es de destacar que DLL1 fue más eficiente que JAG1 soportando la viabilidad celular de los progenitores CD123⁺ CD13^{lo}, lo que concuerda con los números absolutos obtenidos.

Por tanto, nuestros datos indican un efecto significativo de DLL1 y, en menor medida de JAG1, en el mantenimiento de la viabilidad de los progenitores inmediatos de las DC intratímicas, lo que sugiere la implicación de Notch en la inducción de supervivencia de estos precursores.

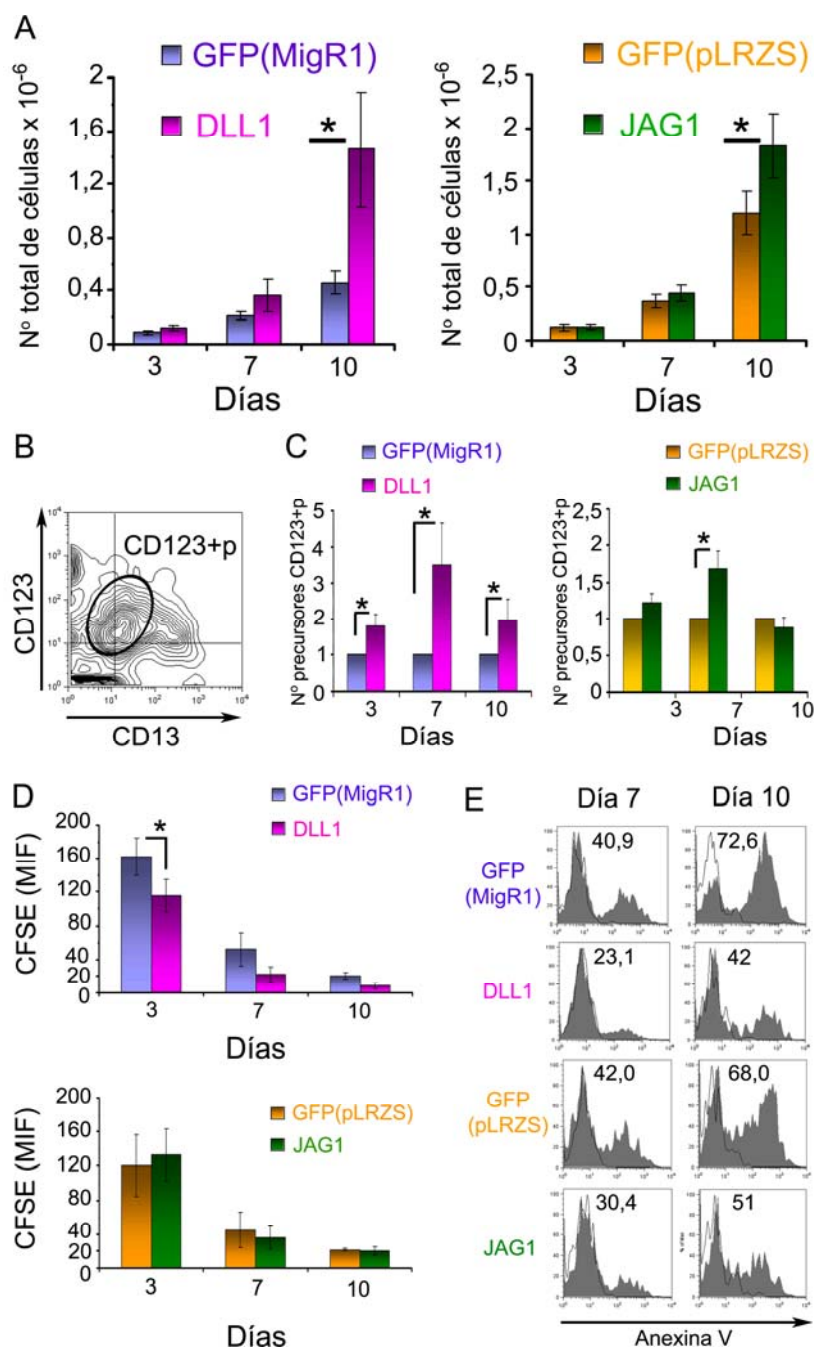


Figura 30. DLL1 y JAG1 inducen la supervivencia de los progenitores mieloides CD123⁺p. (A) Números absolutos de células generadas a partir de progenitores CD123⁺p, derivados de TLMPs como se indica en la Figura 26A, tras su co-cultivo sobre estroma OP9-DLL1 (DLL1), OP9-JAG1 (JAG1) o sus respectivos controles (GFP-MigR1 y GFP-pLRZS,) en presencia de FLT3L e IL-7. Los datos representan la media \pm SEM de los números totales de células recuperadas a día 3, 7 y 10, normalizados para 10^5 progenitores CD123⁺p iniciales en 3 experimentos independientes. *; $P < 0,05$. (B) Análisis de la expresión de CD123 vs CD13 en células procedentes de un cultivo representativo de progenitores CD123⁺p sobre estroma OP9-GFP a día 3. La población de progenitores indiferenciados CD123⁺p se ha resaltado con una elipse. (C) Números de precursores CD123⁺p definidos fenotípicamente como se muestra en (B) a lo largo del cultivo en presencia de OP9-DLL1 y OP9-JAG1. Los valores fueron normalizados a los números obtenidos en los correspondientes

cultivos control (MigR y pLRZS). Los datos mostrados corresponden a la media \pm SEM de 7 experimentos. (D) Análisis de la proliferación de precursores CD123⁺p marcados con CFSE (5 μ M) y co-cultivados sobre OP9-DLL1 (gráfico superior) u OP9-JAG1 (gráfico inferior) o sobre sus respectivos controles. Los datos corresponden a la MIF \pm SEM de CFSE de los progenitores CD123⁺p a días 3, 7, y 10 de cultivo. (E) Cuantificación de la apoptosis inducida en progenitores CD123⁺p cultivados como se ha descrito en (A) durante 7 (izquierda) y 10 días (derecha), mediante marcaje con Anexina V (curvas grises). Los histogramas vacíos representan el control de marcaje en células no permeabilizadas. Los datos corresponden a un experimento representativo de 3. Los números indican el porcentaje de células positivas.

3.3. DLL1 y JAG1 regulan diferencialmente la generación de pDCs y cDCs a partir de sus progenitores mieloides CD123⁺p.

Para analizar directamente el efecto de DLL1 y JAG1 sobre el programa de maduración de los progenitores CD123⁺p, seguidamente examinamos las progenies de DCs generadas en ambos co-cultivos (Figura 31). Observamos una inhibición significativa en la proporción de pDCs diferenciadas en presencia de DLL1, en comparación con su control, que se acompañaba de un incremento relativo de cDCs, especialmente a día 10 (Figura 31A, B; gráficos superiores). Por el contrario, JAG1 no alteró la proporción de pDCs generadas, pero también incrementó, aunque en menor grado que DLL1, la generación de cDCs ($2,4 \pm 0,83$ y $5,13 \pm 0,77$ veces, respectivamente). La señalización inducida por ambos ligandos también resultó en un incremento significativo de la diferenciación de cDCs en términos absolutos (Figura 31B; gráficos inferiores), mientras que los números de pDCs permanecieron inalterados o ligeramente incrementados en respuesta a DLL1 o JAG1, respectivamente (Figura 31A; gráficos inferiores).

Experimentos de marcaje con CFSE o Anexina V no mostraron diferencias significativas en la capacidad de proliferación (Figura 32A) ni en la viabilidad (Figura 32B) de las pDCs y cDCs generadas en respuesta a los diferentes ligandos de Notch, sugiriendo un efecto directo de Notch sobre el programa de diferenciación de los progenitores inmediatos CD123⁺p de las DCs.

Estos datos indican que, una vez los progenitores inmediatos CD123⁺p de las DCs se han generado, DLL1 favorece la diferenciación de cDCs sin afectar significativamente la generación de pDCs. Sin embargo, JAG1 promueve la diferenciación de ambos tipos de DCs, aunque más eficientemente de las cDCs.

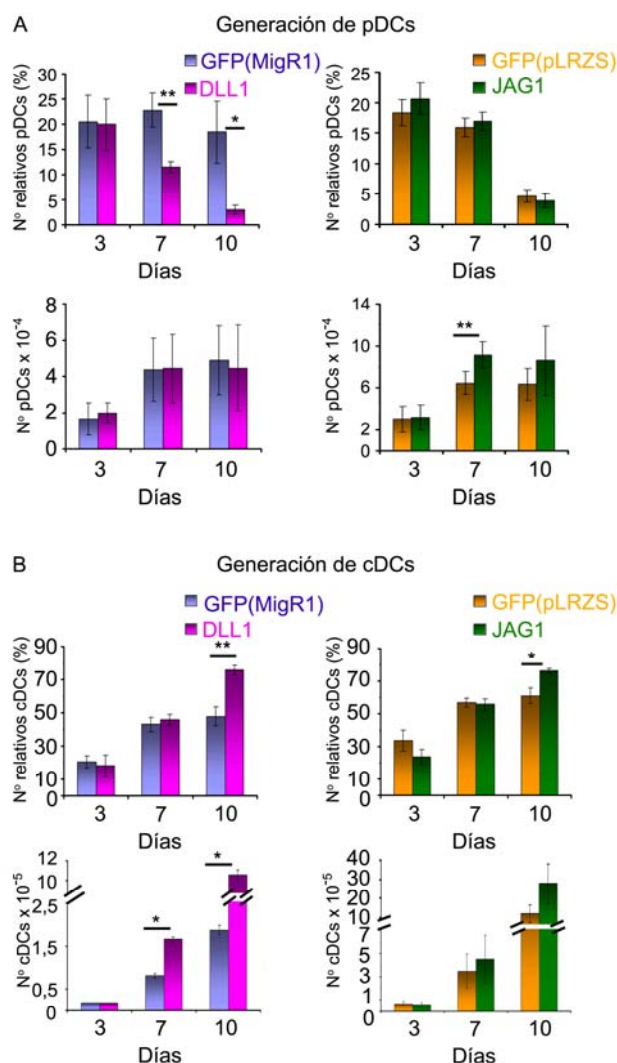


Figura 31. DLL1 y JAG1 soportan la diferenciación de pDCs y cDCs, a partir de sus precursores inmediatos CD123⁺p Generación de pDCs (A) y cDCs (B) a partir de progenitores mieloides CD123⁺p generados a partir de TLMPs en co-cultivos sobre OP9-GFP suplementados con IL-7 y FLT3L durante 3 días. Los progenitores CD123⁺p seleccionados por FACs, se co-cultivaron sobre OP9-DLL1, OP9-JAG1 o sus respectivos controles (GFP-MigR1 y GFP-pLRZS). Los datos representan la media \pm SEM de los porcentajes (gráficas superiores) y números absolutos (gráficas inferiores) normalizados para 10^5 progenitores iniciales (n=6). *, $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

3.4. DLL1 y JAG1 inhiben la generación de células NK a partir de sus progenitores mieloides CD123⁺p.

El hallazgo de que los progenitores CD123⁺p retienen potencial NK, plantea la posibilidad de que Notch regule la generación de este linaje celular a partir de progenitores CD123⁺p, por lo que analizamos la diferenciación de células NK en las condiciones experimentales descritas. La Figura 33 muestra que ambos ligandos de Notch inhibieron la generación de células NK CD56⁺. Esta inhibición fue especialmente significativa en términos relativos (Figura 33A), aunque también se observó una disminución de los números absolutos (Figura 33B). Como observamos para las DCs, no hubo diferencias en la capacidad de

proliferación (Figura 32A), ni en la supervivencia (Figura 32B) de las escasas células NK generadas en respuesta a diferentes ligandos de Notch.

En conclusión, la activación de Notch inducida por los ligandos DLL1 y JAG1 inhibe la generación de células NK a partir de sus precursores mieloides CD123⁺p.

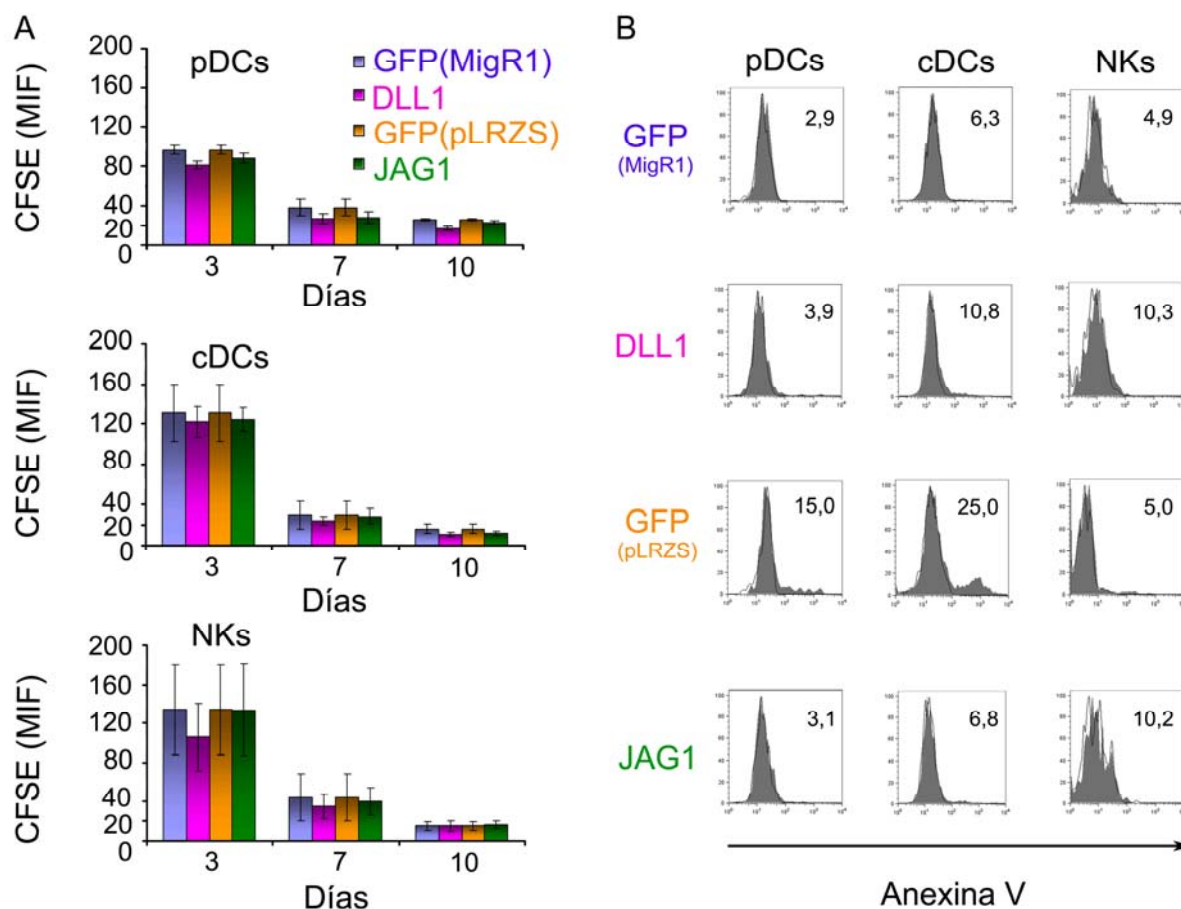


Figura 32. DLL1 y JAG1 no afectan a la proliferación ni a la supervivencia de DCs y NKs generadas a partir de células CD123⁺p. (A) Se marcaron progenitores CD123⁺p con CFSE (5 μ M) durante 10 min a 37°C y se cultivaron en presencia de OP9-DLL1 (DLL1) u OP9-JAG1 (JAG1) o de sus respectivos estromas control (MigR y pLRZs) en las condiciones descritas en la Figura 31. A día 3, 7 y 9 se analizó la MIF de la marca de CFSE en las poblaciones de pDCs (gráfico superior), cDCs (gráfico central) y NKs (gráfico inferior). Los datos representados corresponden a los valores medios \pm SEM de la MIF de 3 experimentos independientes. (B) Cuantificación de la apoptosis en pDCs, cDCs y NKs generadas en los co-cultivos OP9-DLL1 y OP9-JAG1 y sus respectivos controles a día 10. Los histogramas grises muestran la tinción con Anexina V y los vacíos la tinción control en células no permeabilizadas. Los números corresponden al porcentaje de células Anexina V⁺. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo de 3.

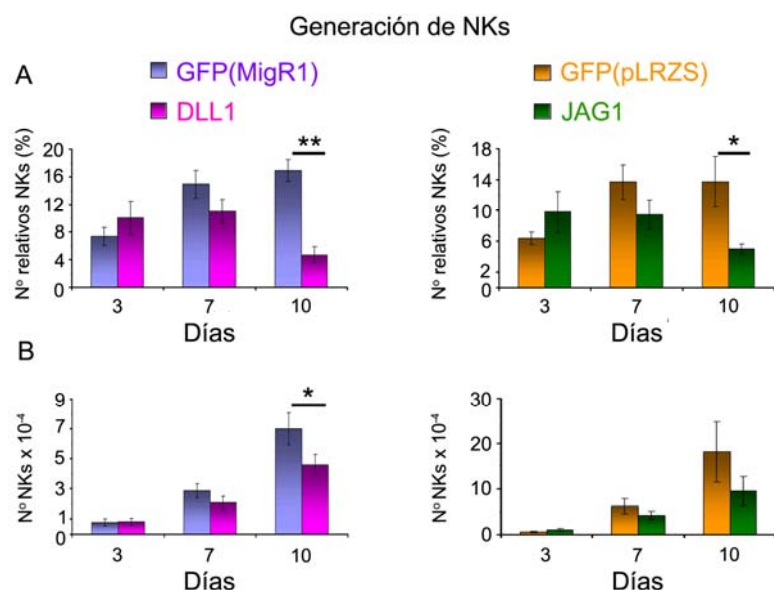


Figura 33. DLL1 y JAG1 inhiben la generación de células NK a partir de sus progenitores CD123⁺p. Los progenitores CD123⁺p se co-cultivaron como se describe en la Figura 31, y la generación de células NK CD56⁺ en los cultivos se analizó por citometría de flujo. Los datos representan la media \pm SEM de los porcentajes (gráficas superiores) y números absolutos (gráficas inferiores) de células NK generadas a partir de 10⁵ progenitores CD123⁺p en 6 experimentos. *, $P < 0,05$, **, $P < 0,01$.

4. Identificación de nuevos patrones de expresión génica en el linaje de pDCs intratímicas. Regulación diferencial por DLL1 y JAG1.

4.1. AIOLOS y PAX 5 se expresan específicamente en las pDCs del timo humano.

Varios estudios han reportado la expresión en las pDCs de diferentes factores de transcripción, entre los que se incluyen SpiB (Schotte et al., 2003; Schotte et al., 2004), Ikaros (Allman et al., 2006; Galy et al., 2000) o Pax5 (Pelayo et al., 2005), que parecen estar implicados en la diferenciación de estas células, al menos en ratón. En humanos, SpiB se expresa selectivamente en las pDCs, pero no en las cDCs, intratímicas (Schotte et al., 2003 y Figura 26 de este estudio); pero desconocemos la relevancia de los dos últimos en el linaje de pDCs. Por tanto, decidimos caracterizar el patrón de expresión *in vivo* de PAX5 y de los tres miembros de la familia de Ikaros (*IKAROS*, *HELIOS* y *AIOLOS*) en células pDCs y cDCs intratímicas y en los progenitores multipotenciales TMLPs. Asimismo, analizamos comparativamente la transcripción de estos genes en los precursores intermediarios mieloides CD123p⁺ y linfoides CD5⁺p derivados de los TLMPs *in vitro*. Como se muestra en la Figura 34A, *IKAROS* se expresa en TLMPs y se induce significativamente y de forma similar en ambos progenitores intermediarios, mientras que la inducción de *HELIOS* es mayor en los progenitores linfoides. Ambos factores de transcripción mantienen niveles de expresión similares en las pDCs y cDCs intratímicas, que son comparables a los expresados *in vivo* por

los progenitores TLMPs. Por su parte, la transcripción de *AIOLOS* se induce específicamente en los progenitores linfoides, manteniéndose en los mieloides a niveles similares a los encontrados en TMLPs. Sin embargo, la diferenciación de los últimos en pDCs se acompaña de un incremento de más de 80 veces en su transcripción que resulta en niveles de expresión 55 veces superiores a los de las cDCs (Figura 34A).

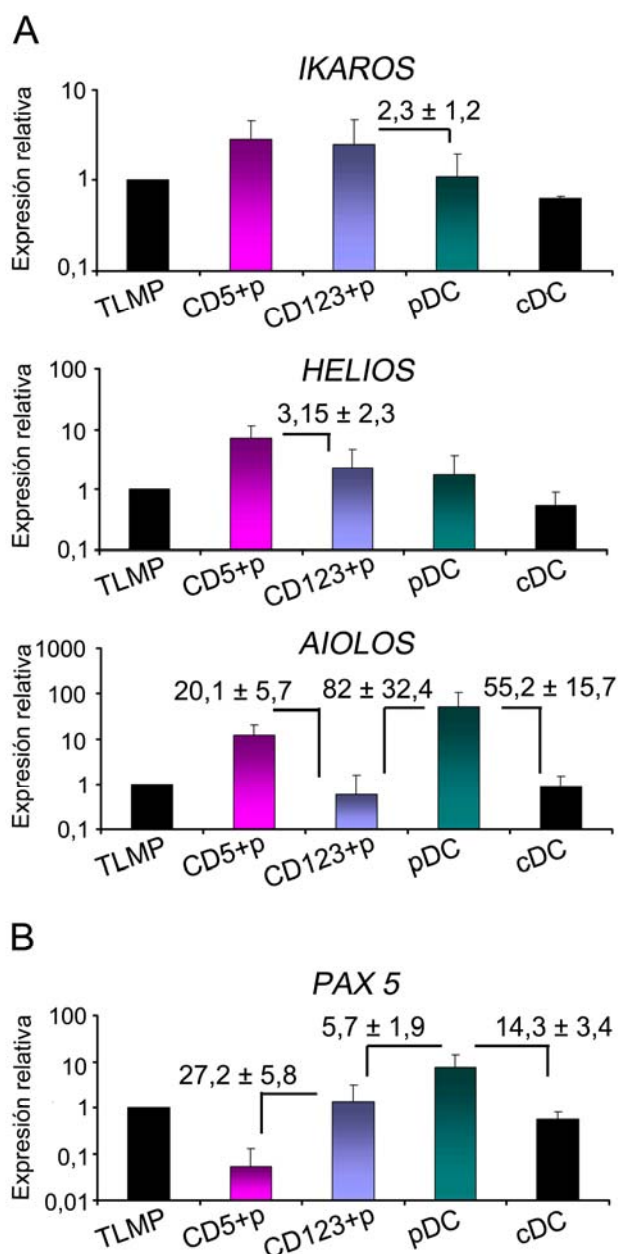


Figura 34. *AIOLOS* y *PAX5* se expresan a niveles elevados en las pDCs residentes en el timo humano. Análisis por Q-PCR de la expresión de los genes de la familia Ikaros: *IKAROS*, *HELIOS* y *AIOLOS* (A) y de *PAX5* (B) en precursores TLMPs y células primarias pDCs y cDCs intratímicas y en progenitores linfoides CD5⁺p y mieloides CD123⁺p generados *in vitro* a partir de TLMPs. Los datos representan los valores medios de expresión ± SEM normalizados para los valores de expresión en los progenitores TLMPs (n=3). Los números indican la diferencia de expresión (número de veces ± SEM) entre las poblaciones resaltadas.

El análisis de la expresión de *PAX5* reveló una reducción significativa en los precursores linfoides CD5⁺p, manteniendo sus niveles en precursores mieloides CD123⁺p e

incrementándose ésta unas 6 veces en pDCs (Figura 34B). Como resultado de esta regulación, los niveles de expresión de *PAX5* en las pDCs son unas 14 veces superiores a los encontrados en las cDCs (Figura 34B).

En resumen, además de *SPIB*, *AIOLOS* y *PAX5* parecen inducirse selectivamente durante la diferenciación de los progenitores intermediarios mieloides CD123⁺p en células pDCs, lo que sugiere la implicación funcional de los tres factores en este proceso.

4.2. *JAG1* y *DLL1* regulan diferencialmente la expresión de *SPIB* y *AIOLOS*.

Nuestros datos sobre la implicación diferencial de *DLL1* y *JAG1* en la generación de pDCs, a partir de sus progenitores inmediatos CD123⁺p, son compatibles con la posibilidad de que Notch regule la expresión de genes asociados al linaje pDC de forma dependiente de ligando. Para analizar esta hipótesis, generamos progenitores CD123⁺p a partir de TLMPs como se ha indicado previamente y analizamos por Q-PCR los posibles cambios inducidos en la expresión de *SPIB*, *AIOLOS* y *PAX5* tras 24h de co-cultivo sobre estroma OP9-GFP, OP9-DLL1 y OP9-JAG1. Asimismo, analizamos la expresión de *HES1*, como control de la activación de la vía de Notch en los co-cultivos (Jarriault et al., 1995; Sandy y Maillard, 2009; Radtke et al., 2010). Como cabría esperar, *DLL1* y *JAG1* indujeron eficientemente la expresión de *HES1* en progenitores CD123⁺p (Figura 35A). El análisis de la expresión de *SPIB*, referida a la inducción de *HES1*, mostró un incremento significativo ($2,15 \pm 0,25$ veces) en los co-cultivos realizados sobre OP9-JAG1, en comparación con cultivos control; mientras que *DLL1* no modificó sustancialmente ($1,06 \pm 0,08$ veces) la expresión de *SPIB* (Figura 35B). Asimismo, la expresión de *AIOLOS* (Figura 35B) también se incrementó específicamente tras 24 h de co-cultivo sobre OP9-JAG1, aunque de forma más variable ($4 \pm 1,9$ veces); pero sus niveles de expresión se mantuvieron tras la señalización por *DLL1* en relación a su control ($1,57 \pm 0,29$ veces). Finalmente, ambos ligandos indujeron un incremento similar en la expresión de *PAX5*, respecto a sus cultivos control en ausencia de activación de Notch (Figura 35 B).

En conjunto, estos resultados indican que la activación de Notch mediada por *JAG1*, pero no por *DLL1*, en los precursores CD123⁺p de las pDCs, induce la expresión de *SPIB* y *AIOLOS*, sugiriendo una regulación ligando-específica por Notch de genes implicados en la diferenciación del linaje de pDCs.

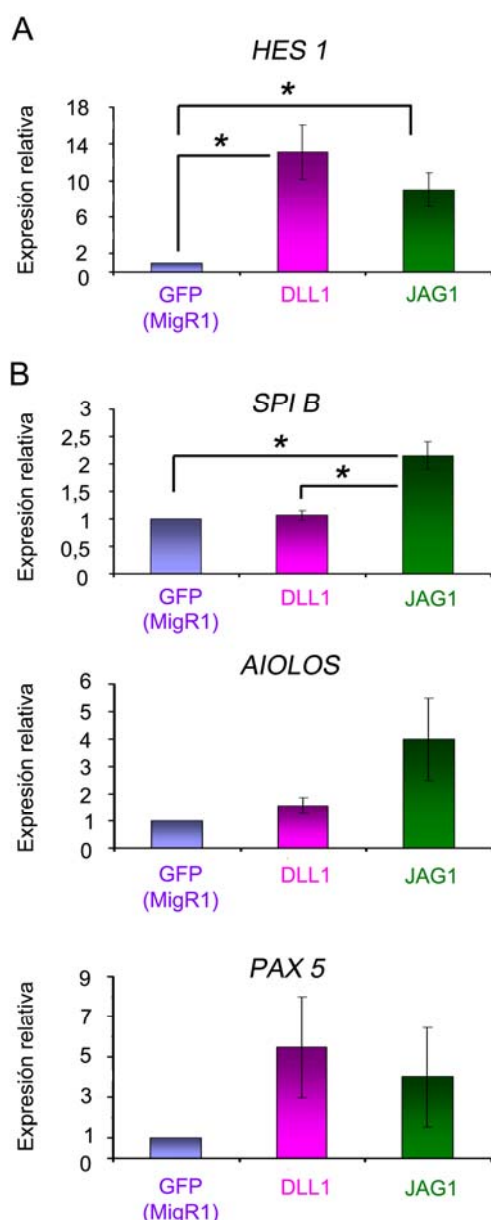


Figura 35. DLL1 y JAG1 inducen diferencialmente la expresión de *SPIB* y *AIOLOS* en los precursores de las pDCs. (A) Análisis por Q-PCR de la expresión relativa de *HES1* en progenitores CD123⁺p derivados de TLMPs como se ha descrito en la Figura 26, tras 24h de co-cultivo sobre OP9-DLL1 (DLL1), OP9-JAG1 (JAG1) u OP9-GFP (MigR1) como control. Los datos representan los valores medios de expresión \pm SEM normalizados para los valores de los progenitores CD123⁺p cultivados sobre estroma control (n=3). *; $P < 0,05$. (B) Análisis por Q-PCR de la expresión relativa de *SPIB*, *AIOLOS* y *PAX5* en las muestras descritas en (A). Los datos representan los valores de expresión medios \pm SEM relativos a la expresión de *HES1* en cada cultivo y normalizados para los valores de los progenitores CD123⁺p cultivados sobre estroma control (n=3). *; $P < 0,05$.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Implicación de las pDCs intratímicas en la generación de nTregs humanas.

1.1. Identificación de los progenitores fisiológicos de las nTregs humanas y potencial tolerogénico de las pDCs residentes en el timo humano.

En este estudio hemos desarrollado un modelo experimental *in vitro* que nos ha permitido analizar el potencial tolerogénico de las pDCs intratímicas humanas e identificar los mecanismos moleculares que podrían estar implicados en la generación de células nTreg *in vivo*. Asimismo, nuestro estudio ha proporcionado las bases celulares de la generación de nTregs en el timo humano, lo que ha permitido caracterizar sus progenitores fisiológicos. Además, nuestros estudios *in situ* han demostrado la existencia de interacciones celulares *in vivo* en la médula tímica entre pDCs y nTregs, lo que avala la relevancia fisiológica de nuestros hallazgos.

Hemos demostrado que, tras su activación con CD40L e IL-3, las pDCs residentes en el timo humano adquieren potentes características tolerogénicas, siendo capaces de inducir la generación de Tregs a partir de linfocitos T CD4⁺ y timocitos CD4SP CD25⁻ alogénicos. Este hallazgo fue corroborado por un trabajo de Liu y colaboradores, publicado simultáneamente al nuestro, en el que se describió la función tolerogénica de las pDCs intratímicas humanas en condiciones alogénicas, tras su activación en respuesta a TSLP (Hanabuchi et al., 2010). A diferencia de este trabajo, nuestro estudio ha intentado establecer el potencial tolerogénico de las pDCs intratímicas en condiciones fisiológicas, utilizando para ello un sistema experimental autólogo, que ha demostrado que las pDCs activadas son incapaces de inducir la generación de nTregs a partir de timocitos CD4SP CD25⁻ autólogos, lo que indica que los progenitores fisiológicos de las células nTreg no están contenidos en el estadio intratímico CD4SP. Nuestra explicación a estos resultados se basa en las características inherentes a las células nTreg. Como ya hemos mencionado, las nTregs poseen un repertorio de TCRs con afinidades de reconocimiento de Ags propios que solapan con el de los linfocitos T autorreactivos (Bennet et al., 2001; Pacholczyk y Kern, 2008). Por tanto, cabría esperar que los progenitores de las células nTreg portasen TCRs de alta afinidad a Ags propios. Sin embargo, la población de timocitos CD4SP convencionales está constituida por células que no han sido eliminadas en base a su alta afinidad por Ags propios y que, en consecuencia,

han superado el proceso de selección negativa, por lo que esta población debe estar enriquecida en células con un repertorio de TCRs característico de células T convencionales portadoras de TCRs con afinidades intermedias a Ags propios (Hsieh et al., 2006). En este escenario, la frecuencia de timocitos CD4SP capaces de activarse en respuesta a los Ags propios presentados por pDCs autólogas y de generar nTregs debe ser extremadamente baja, lo que justificaría nuestros resultados negativos. Por tanto, es esperable que los timocitos CD4SP CD25⁻ carezcan de potencial nTreg en condiciones fisiológicas. De acuerdo con esta interpretación, existen evidencias de que el potencial nTreg se pierde progresivamente durante el proceso madurativo en timocitos de ratón (Wirnsberger et al., 2009). Teniendo en cuenta nuestros datos y los de Liu y colaboradores (Hanabuchi et al., 2010), que demuestran la capacidad de los timocitos CD4SP CD25⁻ de diferenciarse en células Treg en condiciones alogénicas, podemos sugerir que la activación de estas células por el reconocimiento con alta afinidad de Ags para los que no han podido ser seleccionadas negativamente en el timo sería la señal inductora de su diferenciación en Tregs. Por tanto, esta capacidad de diferenciación, podría estar más relacionada con la plasticidad propia del linaje de linfocitos T CD4⁺ de diferenciarse en células Treg observada en periferia, es decir, con su potencial de polarizarse en células iTregs (Annunziato y Romagnani, 2009; Wan, 2010).

Los resultados negativos obtenidos en nuestro sistema experimental autólogo nos llevaron a investigar la posibilidad de que la frecuencia de progenitores de nTregs en condiciones fisiológicas pudiera estar incrementada en un estadio madurativo intratímico previo al proceso selección negativa, aunque tales progenitores deberían haber experimentado con éxito el proceso de selección positiva. Estas características son exclusivas de la población de timocitos DP CD4⁺CD8⁺ TCRαβ⁺ recién seleccionados, que portan un repertorio de TCRs capaces de activarse en respuesta a Ags propios. Por tanto, estos timocitos DP serían los progenitores idóneos de las nTregs, como se había propuesto en ratón (Cabarrocas et al., 2006). Nuestro sistema experimental de generación de células nTregs autólogas corroboró la hipótesis planteada y nos permitió identificar a los progenitores de las células nTreg en la población de timocitos DP que expresan altos niveles de marcadores asociados a la selección positiva, tales como CD69 y TCRαβ (Jordan et al., 2001, Vanhecke et al., 1997). Además, hemos demostrado que la diferenciación de estos precursores en células nTreg depende específicamente de su interacción con pDCs autólogas activadas.

Un aspecto discutible de nuestros resultados se relaciona con la función que desempeñan las pDCs durante el proceso de generación de las nTregs. Cabe la posibilidad de que las pDCs ejerzan su función promoviendo la expansión de progenitores Foxp3⁺ pre-existentes en la población DP CD69^{hi} inicial o, alternativamente, induciendo un proceso de diferenciación *de novo* del linaje Treg. Apoyando la primera posibilidad, los timocitos DP CD69^{hi} contienen una población minoritaria de células CD25⁻ Foxp3⁺ que generan espontáneamente en cultivo bajas frecuencias de células CD25⁺ Foxp3⁺, aunque éstas presentan niveles de expresión de CD25 y Foxp3 sensiblemente más bajos que los observados en las células cultivadas en presencia de pDCs. Estos timocitos DP CD69^{hi} CD25⁻ Foxp3⁺ podrían haber sido activados parcialmente *in vivo* y necesitarían señales accesorias, como se ha sugerido previamente (Tuovinen et al., 2008), que podrían ser otorgadas por las pDCs para su posterior expansión. No obstante, las pDCs también participarían en la determinación del compromiso final de estas células y en la adquisición del fenotipo CD25⁺ Foxp3⁺ convencional, al menos *in vitro*. En efecto, hemos observado que la inducción de la expresión de Foxp3 y CD25 en timocitos DP CD69^{hi} CD25⁻ Foxp3⁻ es dependiente de la participación de las pDCs y conlleva la reducción de la expresión de CD8 y el mantenimiento de CD4, lo que sugiere la inducción de un proceso de diferenciación *de novo* que genera timocitos CD4SP de linaje nTreg. Puesto que las pDCs también inducen la expansión selectiva de células CD25⁺ o de las propias nTregs generadas *in vitro*, no podemos descartar formalmente que las pDCs, además de mediar la diferenciación de estos progenitores Foxp3⁺, sean capaces de inducir su proliferación o supervivencia.

En conclusión, la generación de nTregs en el timo humano podría tener lugar durante una estrecha ventana temporal, inmediatamente después de la selección positiva de aquellos timocitos DP que expresan TCRs autorreactivos, con afinidades menores a las requeridas para inducir su selección negativa, como se ha propuesto en ratón (Hogquist y Moran, 2009). La interacción de estos timocitos con pDCs intratímicas tolerogénicas sería crucial para inducir la diferenciación terminal de las nTregs.

1.2. Mecanismos fisiológicos de activación de las pDCs intratímicas.

Puesto que las pDCs intratímicas humanas han de ser activadas para desarrollar propiedades tolerogénicas, un objetivo importante de esta Tesis Doctoral ha sido identificar las posibles señales que pudieran estar implicadas en la activación de las pDCs residentes en

el timo humano. En este estudio, hemos descrito una población de timocitos presentes *in vivo* cuyo fenotipo es similar al de las células pDCs activadas *in vitro*. La existencia de pDCs activadas en el timo humano también ha sido sugerida por Liu y colaboradores (Hanabuchi et al., 2010). No obstante, los mecanismos inductores de activación de las pDCs en el timo sugeridos por este grupo son diferentes a los que nosotros proponemos. Nuestros datos demuestran que las pDCs intratímicas no son capaces de activarse *in vitro* en respuesta a TSLP, aunque maduran en presencia de CD40L e IL-3. Conforme a esta falta de respuesta a TSLP, Liu y colaboradores han descrito la ausencia de receptores para esta citoquina (TSLPR) en las pDCs intratímicas inmaduras (Hanabuchi et al., 2010), que se induciría tras la activación vía TLR-7 o TLR-9, resultando en la adquisición de la función tolerogénica en respuesta a TSLP. Según estos autores, la pre-activación de las pDCs en respuesta a ligandos de TLR-7 o TLR-9 ocurriría en la periferia, y serían las pDCs periféricas pre-activadas las que ejercerían esta función tolerogénica tras su migración al timo. En este sentido, existen datos en ratón que apoyan la existencia de pDCs periféricas capaces de colonizar el timo (Li et al., 2009). Por tanto, este modelo implica el concurso de pDCs de la periferia que se pre-activarían en respuesta a Ags exógenos, para finalizar su maduración en respuesta a TSLP en el timo, donde ejercerían su función.

En contraste con este modelo, nuestro estudio buscaba la identificación de mecanismos intratímicos de activación que fueran capaces de inducir la maduración de las pDCs en una situación fisiológica ligada a la existencia de células autorreactivas. La población de timocitos DP CD69^{hi} identificada en este trabajo constituye el contexto autorreactivo intratímico que buscábamos, mientras que la activación de la vía CD40-CD40L proporciona la especificidad del proceso de activación de las pDCs. Por tanto, nosotros proponemos un modelo según el cual, el reconocimiento específico de auto-Ags presentados por las pDCs a los timocitos DP CD69^{hi} autorreactivos, durante el desarrollo intratímico, sería la señal que induciría CD40L en éstos y, como consecuencia, activaría la maduración de las pDCs vía CD40. El resultado final sería la inducción TCR-específica del programa madurativo de las nTregs y el escape de la autorreactividad. La relevancia fisiológica de nuestro modelo viene avalada por el hecho de que la transcripción de CD40L parece estar restringida *in vivo* a los timocitos DP activados como consecuencia del proceso de selección positiva (Fuleihan et al., 1995) y, en concreto, a aquellos que expresan altos niveles de CD69 (presente estudio). Además, el suplemento de IL-3 como factor de supervivencia de las pDCs

estaría proporcionado por las células TECs del microambiente tímico (Dalloul et al., 1991). Sin embargo, la expresión de CD40L fue indetectable a nivel proteico en la superficie de los progenitores nTreg, lo que podría cuestionar su relevancia *in vivo*. Este dato sugiere que la expresión de CD40L podría estar regulada temporalmente o estar restringida a una proporción extremadamente baja de células autorreactivas activadas incluidas en la población de timocitos DP CD69^{hi}. De acuerdo con esta interpretación, nuestros resultados demuestran que la activación policlonal de timocitos DP CD69^{hi} *in vitro* vía TCR induce la expresión de CD40L en una fracción reducida de células activadas en las que se inducen selectivamente altos niveles de expresión de CD69. Además, los niveles de expresión de CD40L en estas células son significativamente bajos, por lo que las técnicas utilizadas para su detección *in vivo* podrían tener una sensibilidad insuficiente. Por tanto, CD40L podría inducirse *in vivo* de forma débil, pero funcional, en una fracción restringida de timocitos DP CD69^{hi} que han recibido fuertes señales de activación, similares a los que se esperaría en las células T autorreactivas.

Apoyando un papel regulador de CD40L en la activación de pDCs intratímicas, hemos demostrado que los timocitos DP CD69^{hi} CD40L⁺ activados *in vitro* son capaces de inducir la activación de pDCs inmaduras autólogas y, en consecuencia, la adquisición de potencial tolerogénico. De forma similar, se ha descrito que es necesaria la señalización vía CD40 para inducir la activación de DCs periféricas (Banchereau et al., 2000). Por tanto, la ruta CD40-CD40L desempeñaría una función relevante en el desarrollo de nTregs en el timo humano, tal y como se ha descrito para Tregs periféricas de ratón (Kumanogoh et al., 2001; Spence y Green., 2008). La descripción de que el defecto en la señalización CD40-CD40L da lugar al desarrollo de auto-inmunidad en humanos (Jesus et al., 2008) y ratones (Kumanogoh et al., 2001; Spence y Green., 2008) soporta la relevancia fisiológica de nuestros datos.

En este escenario, proponemos que el reconocimiento con alta afinidad de complejos de MHC-péptidos propios a través de TCRs expresados en la población de timocitos DP seleccionados positivamente, induciría la expresión de CD40L en los progenitores de las nTregs. Como consecuencia, esos precursores tendrían la capacidad única de inducir específicamente la activación de pDCs *in vivo*, mediante un mecanismo de retro-alimentación. Este mecanismo facilitaría un diálogo funcional controlado entre las pDCs y los timocitos durante el desarrollo, dando lugar a la diferenciación terminal de células nTregs. Nuestro hallazgo de la existencia de una población de pDCs activadas en el timo

humano en condiciones basales, sugiere que los mecanismos aquí descritos podrían tener lugar *in vivo*. No obstante, se requieren estudios adicionales que establezcan la relevancia fisiológica de estas pDCs activadas y de la vía CD40-CD40L en dicho diálogo *in vivo*.

1.3. Contribución de las pDCs intratímicas a la generación de células nTregs *in vivo*.

La naturaleza de las APCs intratímicas implicadas en la generación de nTregs era controvertida antes de la realización de este estudio. Algunos trabajos en ratón han sugerido que las TECs corticales participan en el desarrollo de nTregs, induciendo la selección positiva de células portadoras de TCRs de alta afinidad por Ags propios (Bensinger et al., 2001; Jordan et al., 2001). Sin embargo, otros autores defienden la existencia de un nicho saturable, mucho más pequeño que el descrito para la selección positiva convencional, capaz de seleccionar a los progenitores de células nTreg (Bautista et al., 2009; Lio y Hsieh, 2008). De acuerdo con esta idea, las DCs localizadas en la unión cortico-medular y la médula del timo podrían representar ese nicho limitante, atrayendo a timocitos DP seleccionados positivamente por el epitelio cortical y aportando señales únicas (Ladi et al., 2008) que podrían inducir su migración hacia la médula (Witt et al., 2005), donde las DCs inducirían su diferenciación en células nTregs. De acuerdo con esta teoría, se ha demostrado que las DCs residentes en el timo de ratón contribuyen significativamente a la generación de nTregs *in vivo* (Proietto et al., 2008), aunque las TECs podrían jugar el mismo papel en su ausencia (Ohnmacht et al., 2009). En nuestro estudio, hemos demostrado que las cDCs intratímicas, cuyo papel tolerogénico ya había sido analizado en condiciones alogénicas (Watanabe et al., 2005), también son capaces de promover la generación de nTregs a partir de timocitos L-DP CD69^{hi} autólogos al igual que las pDCs. Por tanto, proponemos la existencia de dos nichos diferentes, conformados por las cDCs estimuladas por el TSLP secretado localmente por las mTECs de los corpúsculos de Hassal (Watanabe et al., 2005) y las pDCs activadas tras su interacción con timocitos activados CD40L⁺, como ya hemos discutido. No obstante, la existencia de células epiteliales inductoras del linaje Treg no puede ser excluida (Wirnsberger et al., 2009). De hecho, actualmente se acepta que la generación de nTregs no requiere la participación de un solo tipo de APCs con características únicas, sino que es dependiente de un número mínimo de señales provenientes del microambiente (Wirnsberger et al., 2009).

En apoyo de la contribución de las pDCs a la generación de nTreg, hemos aportado evidencias histológicas de la co-localización de células CD123⁺ y Foxp3⁺ en la médula de

timo humano, que sugieren la posibilidad de una interacción funcional entre ambos tipos celulares *in vivo*. Sin embargo, la inducción de Foxp3 durante el desarrollo de nTreg dura más de dos días. Por tanto, las limitaciones temporales de las técnicas de inmunohistoquímica hacen necesario un análisis dinámico que clarifique si la co-localización de células CD123⁺-Foxp3⁺ que hemos observado refleja la existencia de interacciones duraderas entre progenitores nTreg y las pDCs “inductoras”. Creemos que la posibilidad de contactos duraderos de timocitos-DC, incluso durante días, debe ser considerada, ya que se ha demostrado que los contactos persistentes entre Treg y DCs preceden la inhibición de respuestas auto-inmunes en ratones diabéticos no-obesos (NOD) (Tang y Bluestone, 2006).

En resumen, nuestros datos *in vivo* sugieren que las pDCs residentes en el timo humano contribuyen a la generación de células nTregs, comportándose como potentes agentes tolerogénicos, como ya se ha establecido en el caso de las pDCs periféricas (Colonna et al., 2004; Ochando et al., 2006; Tang y Bluestone, 2006),

1.4. Mecanismos moleculares implicados en la capacidad diferencial de pDCs y cDCs intratímicas de inducir la generación de subtipos funcionales de células nTregs.

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido identificar los mecanismos moleculares responsables de la inducción por pDCs y cDCs intratímicas de la diferenciación de timocitos L-DP CD69^{hi} en células nTreg. Nuestros resultados han demostrado que CD86 y en menor medida CD80, son críticos en la capacidad de pDCs y cDCs intratímicas de inducir la generación de nTregs. Por tanto, la ruta de activación de CD28 parece ser esencial en la generación de nTregs humanas, al igual que se ha descrito en el modelo de ratón (Fontenot et al., 2003). Estos datos han sido confirmados recientemente en el modelo de inducción de nTregs humanas por pDCs alogénicas (Hanabuchi et al., 2010).

Además de CD80 y CD86, ambos tipos de DCs intratímicas humanas inducen ICOSL durante el proceso de maduración. Estos datos difieren de los descritos en periferia, donde se ha observado que ICOSL se induce exclusivamente en pDCs y está implicado en la generación de Tregs productoras de IL-10 (Ito et al., 2007). La identificación de Tregs humanas ICOS⁺ e ICOS⁻ con perfiles opuestos de expresión de IL-10 y TGF- β (Ito et al., 2008) sugiere un papel específico de ICOSL en la inducción de Tregs productoras de IL-10. En nuestro sistema, las nTregs generadas en presencia de pDCs ejercen su función supresora a través de la secreción de IL-10, mientras que aquellas inducidas por cDCs lo hacen

mediante la producción TGF- β . Sin embargo, las pDCs y cDCs residentes en el timo humano parecen controlar la dicotomía funcional de las nTregs de forma independiente de ICOSL. Por tanto, dicha especialización funcional podría tener su origen en: 1) la capacidad diferencial de pDCs y cDCs de presentar Ags distintos y de seleccionar repertorios de Treg no redundantes (Young et al., 2008), o 2) en la expresión diferencial de ligandos en ambas poblaciones de DCs que activasen moléculas distintas, aún no descritas, en los precursores DP CD69^{hi}.

En este último caso, la elevada expresión de CD69 en progenitores de nTregs podría sugerir la implicación directa de esta molécula en la inducción del programa madurativo hacia células nTreg. De hecho, se ha demostrado que los ratones deficientes para la expresión de CD69 (CD69KO) muestran respuestas inflamatorias exacerbadas en modelos experimentales de miocarditis autoinmune (Cruz-Adalia et al., 2010), asma y dermatitis por contacto (Martín et al., 2010), en comparación a las observadas en ratones salvajes. Según describen los autores, este efecto se debe a un incremento en una respuesta de tipo TH17 en estos ratones CD69KO que magnificaría los procesos inflamatorios descritos, presumiblemente por un desbalance celular TH17-Treg. Sin embargo, en estos animales no se analizó si las proporciones de células Treg eran normales. Puesto que se ha descrito que el balance entre células Treg y TH17 es importante en la regulación de la inflamación y el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Afzali et al., 2007; Mai et al., 2010), es relevante plantear estudios futuros que analicen el impacto de la ausencia de CD69 en la generación de células nTreg en el modelo humano. Por otro lado, dado que la presencia de DCs es necesaria para permitir la diferenciación de timocitos DP CD69^{hi} en células nTregs, el estudio de la existencia de posibles ligandos de CD69 expresados en las diferentes poblaciones de pDCs y cDCs intratímicas ha pasado a ser uno de nuestros objetivos inmediatos.

En resumen, todos los datos obtenidos en este estudio nos han llevado a la elaboración de un modelo que intentaría explicar el origen de las nTregs humanas y la contribución al proceso de las diferentes poblaciones de APCs intratímicas (Figura 36). Según este modelo, los timocitos DP que no fueran capaces de seleccionarse positivamente en la corteza tímica expresarían niveles bajos de CD69 y serían eliminados por apoptosis, mientras que aquellos timocitos DP que hubieran sido capaces de activarse en respuesta a Ags propios serían seleccionados positivamente y expresarían niveles elevados de CD69. Dentro de esa población, las células DP CD69^{hi} portadoras de TCRs autorreactivos con afinidades altas o

intermedias podrían dar lugar a nTregs, eficientes productoras de $\text{TGF}\beta$, tras su interacción con cDCs activadas por TSLP o mTECS en la médula tímica. Además, aquellos timocitos DP CD69^{hi} con una afinidad muy alta por Ags propios, serían capaces de inducir transitoriamente CD40L tras su activación en la corteza, lo que permitiría la activación *in situ* de pDCs en la unión cortico-medular o la médula, que llevaría a la inducción de nTregs productoras de altas cantidades de IL-10. En conjunto, este modelo ayudaría a entender la generación de nTregs humanas de una forma regulada y no-redundante. Además, explicaría en parte la existencia de repertorios de TCRs en la población de nTregs parcialmente solapantes con los de las células autorreactivas y células T convencionales.

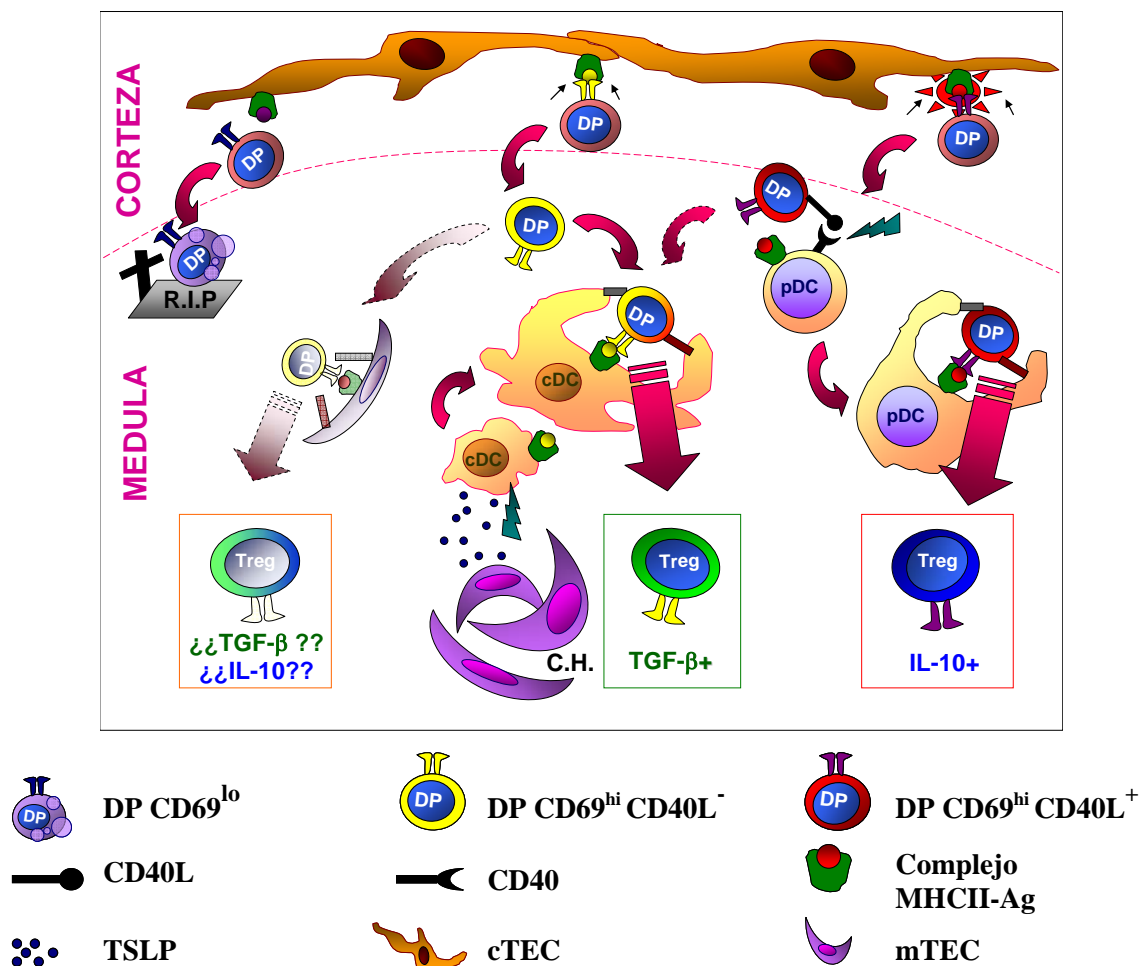


Figura 36. Modelo de la generación de nTregs en el timo humano.

2. Estudio del origen de las pDCs intratímicas humanas, su relación con los linajes de cDCs y NKs, y la participación de la vía de Notch como posible regulador de su generación en el timo.

2.1. Identificación de las rutas madurativas implicadas en la generación de pDCs a partir de progenitores TLMPs multipotenciales de timo humano.

Uno de los objetivos capitales de este estudio ha sido dilucidar si las pDCs se diferencian a partir de TLMPs humanos siguiendo una ruta intermediaria independiente o común al linaje de las cDCs. Para ello ha sido clave la utilización del sistema experimental OP9, que permite la diferenciación de pDCs a partir de TLMPs (Fohrer et al., 2004). La búsqueda de progenitores intermediarios con marcadores propios de pDCs en este sistema, nos llevó a la identificación de la población de precursores CD123⁺, que específicamente contiene potencial de diferenciación de pDCs y cDCs. Estos precursores CD123⁺p expresan genes como *SPIB* e *IRF8*, implicados en el desarrollo de pDCs (Schotte et al., 2004; Tsujimura et al., 2003), y *PU.1* e *IRF4*, reguladores de la diferenciación de cDCs (Anderson et al., 2000; Tamura et al., 2005). Asimismo, los progenitores CD123⁺p muestran baja expresión de genes asociados al linaje de células T. El análisis fenotípico de estos precursores nos ha permitido determinar que esta población expresa marcadores mieloides y ha disminuido la expresión de marcadores linfoides como CD5, aunque mantiene niveles altos de CD7, lo cuál indica su origen intratímico (datos no mostrados). Además, los progenitores CD123⁺p caracterizados en este estudio expresan elevados niveles de CD44 y CD33, por lo que podrían estar contenidos en la población de precursores intratímicos mieloides DC/NK previamente descritos por nuestro grupo (de Yébenes et al., 2002; Márquez et al., 1995 y 1998). En efecto, hemos podido confirmar que la población de precursores mieloides CD34^{lo} CD44^{hi} CD33⁺ aislada *ex vivo* de timo humano incluye células CD123⁺ y es capaz de generar pDCs y cDCs en nuestro sistema experimental. Además, hemos comprobado que los progenitores CD123⁺p son capaces de generar células NK *in vitro*. Por tanto, nuestros datos sugieren que las pDCs intratímicas humanas podrían originarse *in vivo* en el timo a través de una ruta intermediaria mioide común a la de las cDCs, como se ha sugerido previamente en periferia (Onai et al., 2007), que sería independiente del linaje de linfocitos T.

Una cuestión importante que no hemos podido resolver es si la población CD123⁺p contiene progenitores clonales pDC/cDC. Manz y colaboradores han sugerido que las

poblaciones de progenitores CMP y CLP humanos periféricos contienen precursores clonales pDC/cDC en modelos *in vitro* (Chicha et al., 2004). Sin embargo, el potencial proliferativo y de diferenciación de ese tipo de progenitores es aún relativamente alto, por lo que no puede descartarse la generación de precursores intermediarios al igual que ocurre con los progenitores TLMPs, que pudieran dar lugar a pDCs y cDCs de forma independiente. En el caso de los precursores CD123⁺p mieloides aquí descritos, la rápida cinética con la que se diferencian, su limitado potencial de proliferación y la falta de sistemas experimentales que permitan visualizar la formación de colonias exclusivas de pDCs o cDCs, limitó la posibilidad de realizar estudios que pudieran responder a esta cuestión. De hecho, intentamos analizar el potencial clonal pDC/cDC de los progenitores CD123⁺p mediante el análisis por “*nested-RT-PCR*” de la expresión diferencial de *SPIB* y *PU.1* en estos cultivos clonales. Desafortunadamente, ambos tipos de DCs, pDCs y cDCs, expresan transcritos de *SPIB* y *PU.1* (Figura 26), difiriendo tan sólo en los niveles de expresión por lo que la sensibilidad de la técnica no nos permitió establecer diferencias significativas entre ambos tipos celulares (datos no mostrados). A favor de la existencia de progenitores comunes pDC/cDC, se ha demostrado la existencia en la MO de ratón de una población de progenitores mieloides FLT3⁺ M-CSFR⁺ bi-potenciales pDC/cDC a nivel clonal (Onai et al., 2007). Esta población es fenotípicamente similar a la descrita en este estudio, ya que los progenitores CD123⁺p expresan FLT3 y receptores de linaje mieloide como el GM-CSFR. Sin embargo, los progenitores CD123⁺p generan células NK, además de pDCs y cDCs con cinéticas diferentes. El hecho de que las pDCs se diferencien antes que las cDCs y NKs y que éstas últimas lo hagan de forma simultánea, podría sugerir la existencia de precursores pDC y cDC/NK independientes incluidos en la población de progenitores CD123⁺p. De hecho, nuestros estudios previos han demostrado formalmente la bi-potencialidad cDC/NK de estos precursores a nivel clonal (Márquez et al., 1998). No obstante, no podemos descartar formalmente que las pDCs y cDCs se generen a partir de un progenitor clonal común y difieran sin embargo en su capacidad proliferativa. En conclusión, hemos demostrado que los progenitores de las pDCs y cDCs intratímicas están incluidos en una población de precursores CD123⁺p con características fenotípicas y genotípicas mieloides. Para ampliar el conocimiento de la relación ontogénica de los linajes de pDCs y cDCs a nivel clonal, creemos necesario el desarrollo de técnicas que permitan la expansión temprana de

progenitores CD123⁺p y faciliten el análisis de la generación de pDCs y cDCs derivadas de un único progenitor inicial.

2.2. Diferencias en el potencial NK de los progenitores intermediarios mieloides CD123⁺p y linfoides CD5⁺p.

De forma novedosa, hemos descrito que los progenitores CD123⁺p pueden generar células NKs de forma independiente de la IL-2, al contrario que los progenitores linfoides CD5⁺p. Estos datos plantean la pregunta de si la IL-2 es necesaria para inducir la diferenciación de NKs intratímicas, o si su papel está más relacionado con la expansión y maduración de progenitores de este linaje, como se ha sugerido (Becknell y Caligiuri, 2005; Farag y Caligiuri, 2006). De hecho, se ha descrito que la ausencia del receptor de IL-2 no afecta a la generación de NKs intratímicas *in vivo* (Vosshenrich et al., 2005), mientras que FLT3L e IL-7 podrían estar implicados (Cheng et al., 2009; Di Santo et al., 2006; McKenna et al., 2000). El hecho de que los precursores CD123⁺p sean más eficientes generando células NK en ausencia de IL-2 que los precursores CD5⁺p, podría indicar que la frecuencia de progenitores de linaje NK es mayor en la población de precursores CD123⁺p. Siguiendo ese esquema, la IL-2 jugaría un papel secundario en el proceso, mediando la expansión selectiva de progenitores NK que llevaría al incremento en los números de células NKs generadas a partir de progenitores CD123⁺p y permitiendo la visualización del potencial NK de los precursores linfoides CD5⁺p que, en condiciones basales sería muy limitado. Una explicación alternativa del diferente potencial NK de las poblaciones de precursores CD123⁺p y CD5⁺p, podría basarse en la idea de que ambas poblaciones de progenitores generan células NK a través de programas madurativos distintos que no requieren de las mismas señales, como se ha sugerido para células NK periféricas e intratímicas en ratón (Di Santo y Vosshenrich, 2006). En ese caso habríamos esperado encontrar fenotipos diferentes en las poblaciones de NK generadas a partir de ambos progenitores. Sin embargo, nuestros resultados indican que, a excepción de la expresión de CD5, el fenotipo de ambos tipos de células NK es similar y coincide con el esperado para células NK intratímicas. De hecho, hemos observado que la proporción de células NK CD5⁺ generadas a partir de progenitores CD5⁺p disminuye a lo largo del tiempo (datos no mostrados). Esta observación podría indicar que las células NK derivadas de precursores CD5⁺p expresan inicialmente CD5 como un vestigio del progenitor del que provienen y pierden su expresión a medida que avanzan en su programa madurativo.

No obstante, para dilucidar si ambas progenies de células NK, derivadas de precursores CD123⁺p y CD5⁺p, representan el mismo tipo celular o dos tipos independientes es necesario estudiar sus propiedades funcionales en ensayos específicos.

Por último, es importante recordar que, en presencia de FLT3L y ausencia de IL-2, los progenitores CD123⁺p dan lugar simultáneamente a células NK, pDCs y cDC. En estas condiciones, no podemos descartar que las DCs aporten señales o factores de crecimiento que pudieran suplir la ausencia de IL-2 e inducir la diferenciación de células NK. En este sentido, se sabe que la IL-15 induce la diferenciación de precursores NK (Becknell y Caligiuri, 2005; Williams et al., 1998) y es producida por DCs (Castillo et al., 2009; Lucas et al., 2007). De hecho, se ha demostrado que la eliminación de DCs reduce severamente la generación de NKs *in vivo*, (Guimond et al., 2010). En caso de ser cierta esta hipótesis, las diferencias en el potencial NK de progenitores CD123⁺p y CD5⁺p que hemos observado en ausencia de IL-2 se deberían únicamente a la presencia de diferentes factores de crecimiento que podrían soportar la generación de células NK de forma IL-2 independiente en cada cultivo, y no a una capacidad diferencial de ambos progenitores de madurar hacia el linaje NK. Por tanto, estudiar esta posibilidad parece crucial a la hora de entender el potencial NK de progenitores intermediarios mieloides y linfoides de timo humano y la estirpe celular de ambos subtipos de células NK.

2.3. Regulación diferencial de la generación de células pDC, cDC y NK intratímicas y sus progenitores por distintos ligandos de Notch.

Durante los últimos años, se ha establecido que la función más relevante de Notch en el timo es la instrucción de los progenitores TLMPs hacia el linaje T, a expensas de otros potenciales, y la posterior inducción de proliferación en el estadio pre-T (García-Peydró et al., 2006; Taghon et al., 2009; Yuan et al., 2010). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio indican que distintos ligandos de Notch, en particular DLL1 y JAG1, son capaces de regular diferencialmente la generación de células DCs y NKs a partir de TLMPs a varios niveles. En concreto, hemos demostrado que estos ligandos regulan: 1) la generación de progenitores CD123⁺p a partir de progenitores TLMPs, 2) la supervivencia de los progenitores CD123⁺p una vez generados y 3) el potencial de diferenciación de los progenitores CD123⁺p en células pDCs, cDCs y NKs.

Según nuestros datos, en momentos tempranos del desarrollo intratímico, el ligando JAG1 permitiría la generación de progenitores mieloides CD123⁺p a partir de TLMPs, mientras que DLL1 inhibiría su generación, pero induciría eficientemente la diferenciación de progenitores linfoides CD5⁺p. Por tanto, es muy probable que los progenitores que colonizan el timo humano sólo puedan generar precursores mieloides CD123⁺p en localizaciones intratímicas restringidas, que expresen selectivamente ligandos JAG1. En este sentido, se ha demostrado una distribución selectiva de DLL1 y JAG1 en corteza y médula en el timo de ratón (Lehar et al., 2005) y datos muy recientes de nuestro grupo (García-León et al., resultados no publicados) demuestran que, también en el timo humano, la expresión de JAG1 se restringe a la médula. Puesto que las DCs intratímicas se localizan específicamente en la médula del timo (Bendriss-Vermare et al., 2002; Wu y Shortman, 2005), proponemos la posibilidad de que una pequeña fracción de progenitores TLMPs, que escapa a la señalización por ligandos DLL1 (o DLL4), reciba una señal de JAG1 en la unión cortico-medular tras su llegada al timo, y pueda diferenciarse *in situ* en DCs a través de la generación de progenitores mieloides CD123⁺p (Figura 37).

Otra cuestión importante que se desprende de nuestro estudio se relaciona con la posible regulación temporal de la funcionalidad de Notch durante el desarrollo de un linaje celular. La pregunta que nos planteamos es si, una vez generados, los progenitores CD123⁺p pueden activar la vía de Notch y si esta señalización tendrían algún efecto en su capacidad de diferenciación en pDCs, cDCs y NKs. En este sentido, nuestros datos indican que los precursores mieloides CD123⁺p expresan receptores Notch con un patrón diferente al observado en precursores linfoides CD5⁺p y progenitores TMLPs más inmaduros. De hecho, hemos encontrado que la expresión de *NOTCH4* se restringe a la población CD123⁺p y está muy elevada en pDCs intratímicas. Además, se ha descrito que Notch4 es capaz de reconocer a JAG-1 (Uyttendaele et al., 2000) y se expresa en células mieloides (Singh N et al., 2000). En consecuencia, nuestros resultados sugieren que ambas poblaciones de precursores intermediarios, CD123⁺p y CD5⁺p, podrían activar diferentes receptores Notch *in vivo* a través del reconocimiento de distintos ligandos, en función de su afinidad (Shimizu et al., 2000a y 2000b). Apoyando esta teoría, hemos demostrado que los progenitores CD123⁺p responden *in vitro* de forma diferente a DLL1 y JAG1, de modo que ambos ligandos regulan desigualmente importantes funciones como su viabilidad y su potencial de generación de células pDCs, cDCs y NKs.

En primer lugar, nuestros resultados indican que DLL1, y en menor medida JAG1, facilitan la supervivencia de los progenitores CD123⁺p *in vitro*, aunque ninguno de ellos afecta su capacidad de proliferación ni la de su progenie. Como consecuencia, los números de precursores CD123⁺p y de su progenie aumentan *in vitro* cuando Notch se activa por cualquiera de estos ligandos. Estos resultados se relacionan con diversos trabajos que ya han sugerido un papel de estos ligandos de Notch en el mantenimiento de la supervivencia de los precursores hematopoyéticos (Cheng et al., 2003 y 2007; Vercauteren y Sutherland; 2004). Por otra parte, en términos de diferenciación, hemos demostrado que DLL1 y JAG1 son capaces de inhibir la diferenciación de células NK a partir de sus progenitores mieloides CD123⁺p. Este mismo efecto de JAG1 y DLL1 fue observado para progenitores linfoides CD5⁺p cultivados en presencia de IL-2 (datos no mostrados). Por tanto, nuestros datos sugieren un mecanismo general de la vía de Notch en la represión del potencial NK en progenitores intratímicos, como previamente había sido descrito por nuestro grupo en progenitores más primitivos como los TLMPs (García-Peydró et al., 2006). En contraste con esta idea, se ha descrito la existencia de células NK residentes en el timo de ratón que expresan genes diana de Notch, tales como GATA3 o el IL7R (Vosshenrich et al., 2006), por lo que no podemos descartar que la señalización a través de Notch pueda estar regulada temporalmente durante el desarrollo de las células NK, siendo importante en momentos concretos del proceso. En oposición al efecto inhibitorio de DLL1 y JAG1 sobre la diferenciación NK, ambos ligandos favorecen la diferenciación de cDCs a partir de progenitores CD123⁺p, incrementando significativamente los números de cDCs generadas. Aunque este efecto podría interpretarse como una ventaja de crecimiento de las cDCs inducida por la activación de Notch, existen datos objetivos en contra de esta posibilidad. En efecto, las cDCs generadas *in vitro* en nuestro estudio en presencia de DLL1 o JAG1 no proliferan más que aquellas generadas en ausencia de activación de Notch. Además, se ha descrito que la activación de Notch es necesaria para mantener la homeostasis de un subtipo de cDCs *in vivo* (Caton et al., 2007) e induce la diferenciación de cDCs *in vitro* a partir de progenitores HSCs de ratón (Cheng et al., 2007). Asimismo, estudios en humanos han demostrado que DLL1 induce la diferenciación *in vitro* de MoS de sangre periférica en cDCs, a expensas de la generación de Mφs (Ohishi et al., 2001). Por tanto, es posible pensar en una función instructiva de Notch durante el proceso de diferenciación de las DCs. En concreto, la activación de Notch vía DLL1 o JAG1 en los progenitores mieloides CD123⁺p generados en

el timo podría favorecer la diferenciación de las cDCs intratímicas humanas. Esta función inductora contrasta con la visión preexistente sobre la función represora de Notch en la generación de cDCs a partir de los precursores intratímicos más tempranos (García-Peydró et al., 2006) y demuestra que la función de Notch en el desarrollo de distintos linajes celulares, incluido el de las cDCs, es dependiente del estadio madurativo y el momento específico del desarrollo de ese linaje.

Finalmente, nuestro estudio ha revelado que DLL1 y JAG1 ejercen diferentes efectos en la generación de pDCs a partir de sus precursores CD123⁺p. La activación de Notch vía DLL1 reduce la proporción, pero no los números absolutos, de pDCs, lo que descartaría un efecto inhibitor significativo de DLL1 sobre la diferenciación de los precursores CD123⁺p hacia el linaje pDC. Por el contrario, JAG1 incrementa los números de células pDCs que se generan a partir de sus precursores. Como hemos observado para las cDCs, este incremento no parece ser debido a un efecto sobre la capacidad de proliferación de las pDCs, sugiriendo un efecto directo en la inducción de su diferenciación. La conclusión es que JAG1 estimularía la diferenciación de ambos tipos de DCs. Sin embargo, hay que considerar que los ligandos de Notch promueven la supervivencia de los progenitores inmediatos de ambas DCs, lo que justificaría el incremento observado en la producción de pDCs y cDCs en presencia de JAG1. Conforme a esta interpretación, sería esperable que, si no existiera un efecto de DLL1 sobre el potencial de diferenciación pDC/cDC de los progenitores CD123⁺p, también se generasen números incrementados de ambos tipos de DCs en estos cultivos. Por el contrario, DLL1 sólo favorece la diferenciación de cDCs, lo que plantea dos posibles escenarios: 1) DLL1 induce la diferenciación de cDCs a expensas de la de pDCs a partir de un progenitor común y 2) DLL1 expande selectivamente una subpoblación de progenitores específicos de cDCs incluidos en la población progenitora CD123⁺p. Aunque para discernir entre estas posibilidades es necesario recurrir a ensayos clonales que, como ya se ha mencionado, no están disponibles en la actualidad, en cualquiera de estos escenarios, nuestros datos demuestran que la activación de Notch inducida por DLL1 o JAG1 tiene efectos diferentes sobre la diferenciación de los progenitores mieloides CD123⁺p en células pDCs, lo que explicaría el efecto descrito previamente sobre TLMPs humanos (Dontje et al., 2006).

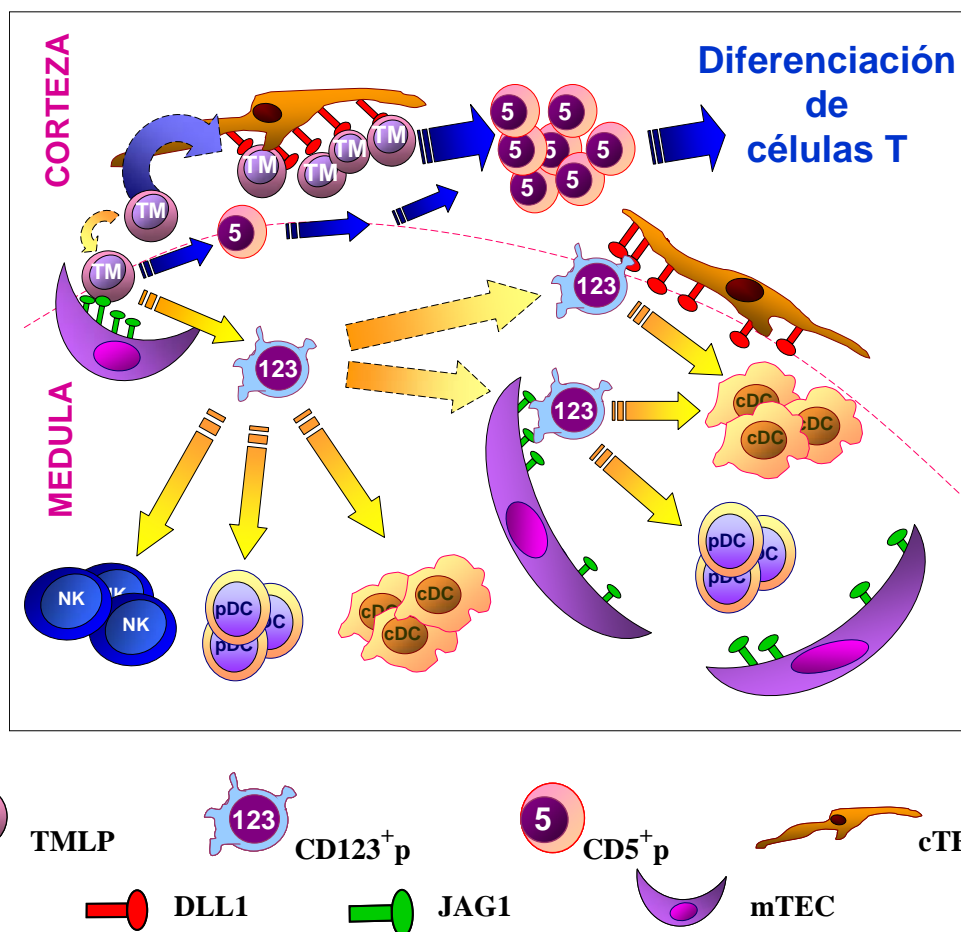


Figura 37. Modelo de la regulación por DLL1 y JAG1 de la generación de células DCs y NKs intratímicas.

En conclusión, nuestros datos indican que ambos ligandos JAG1 y DLL1 promueven la supervivencia de los progenitores mieloides CD123⁺p, al mismo tiempo que inhiben su potencial NK y favorecen el de cDCs; pero difieren al menos en su capacidad de regular la generación de pDCs. Por tanto, la distribución selectiva de los ligandos de Notch en nichos intratímicos concretos podría constituir el mecanismo de regulación de la producción de los linajes non-T en el timo. Esta interpretación se ha plasmado en la elaboración de un modelo que explicaría la generación de progenitores mieloides y la regulación de su potencial de generación de DCs y NKs en respuesta a distintos ligandos de Notch (Figura 37). Según este modelo, los TLMPs que colonizan el timo recibirían mayoritariamente una señal de DLL1 (o DLL4), favoreciendo la generación de progenitores linfoides CD5⁺p, a costa de la generación de progenitores mieloides, que migrarían a la corteza para generar linfocitos T. No obstante,

una baja proporción de TLMPs podrían ser estimulados vía JAG1 en la unión cortico-medular, generando los dos tipos de progenitores intermediarios, mieloides y linfoides. Aquellos progenitores mieloides que no recibieran señales adicionales de Notch darían lugar a células NK y DCs. En caso de señalización vía JAG1 perderían su potencial NK y generarían pDCs y cDCs; mientras que la activación de Notch inducida por ligandos DLL1 expresados en la unión cortico-medular inhibiría su potencial NK y favorecería la generación de cDCs, afectando parcialmente la de pDCs.

2.4. La activación de Notch vía DLL1 o JAG1 regula diferencialmente la expresión de genes asociados al linaje de pDCs.

Como acabamos de discutir, nuestros datos son compatibles con la posibilidad de que el distinto efecto que ejercen DLL1 y JAG1 sobre la diferenciación de células pDC a partir de sus progenitores fuera debido a su capacidad de enviar señales distintas a estos progenitores y, por tanto, de regular diferencialmente el programa madurativo que gobierna la generación de células pDCs en el timo. Dicho programa parece ser extremadamente complejo y podría implicar la participación de diversos factores de transcripción y la señalización a través de receptores de factores de crecimiento (Reizis, 2010), cuya relevancia no se conoce con precisión. Entre ellos, el factor de transcripción Ikaros es necesario para la generación de pDCs en ratón (Allman et al., 2006) y Pax5 se expresa en un subtipo de pDCs residentes en la MO (Pelayo et al., 2005); pero la expresión de estos factores no había sido descrita en pDCs humanas con anterioridad a este estudio y fue uno de nuestros objetivos. Estos estudios mostraron que la elevada expresión de *PAX5* está conservada en las pDCs intratímicas humanas que, además, expresan selectivamente altos niveles del factor de transcripción *AIOLOS*, perteneciente a la familia Ikaros. Asimismo, otros miembros de esta familia, *IKAROS* y *HELIOS*, se expresan en pDCs y cDCs intratímicas de forma similar. Por tanto, existe la posibilidad de que el programa genético mediado por estos factores de transcripción esté implicado en la generación de pDCs humanas.

La elevada expresión de *PAX5* y *AIOLOS* en pDCs humanas es sumamente interesante, ya que ambos factores han sido implicados en el desarrollo de las células B, al igual que otros importantes reguladores de la diferenciación de pDCs, como SPIB e IRF8 (Su et al., 1997; Wang et al., 2008). De hecho, se ha sugerido que Pax5 podría activar directamente la transcripción de *Aiolos*, *SpiB* y *E2-2* en ratón (Pridans et al., 2008). Además,

la expresión de *AIOLOS*, que se ha implicado también en la linfopoyesis T (Schmitt et al., 2002), es inducida durante la diferenciación de los linfocitos B por los reguladores del desarrollo de DCs Irf-4 e Irf-8 (Ma et al., 2008). Por tanto, Pax5 y Aiolos se vislumbran como nuevos reguladores de la diferenciación de las pDCs humanas.

Aunque la implicación directa de estos factores de transcripción en el desarrollo de las pDCs intratímicas constituye un estudio independiente de éste, los patrones de expresión génica observados en las pDCs, en concreto *AIOLOS* y *PAX5*, junto con *SPIB*, se han utilizado aquí como criterio para analizar la capacidad de DLL1 y JAG1 de regular diferencialmente la expresión de genes relacionados con el linaje de pDCs en sus progenitores CD123⁺p, en relación con su efecto funcional sobre la generación de pDCs. En efecto, hemos observado que DLL1 y JAG1 regulan diferencialmente la transcripción de *SPIB*, que no se afecta por DLL1 pero se induce significativamente por JAG1. Por tanto, DLL1 no participa en la regulación de *SPIB* en los progenitores CD123⁺p, aunque inhibe su expresión y, por tanto, la diferenciación de pDCs en progenitores TMLP (Dontje et al., 2006). Además de *SPIB*, *AIOLOS* se induce también tras la activación dependiente de JAG1, pero permanece constante tras la inducción por DLL1, mientras que PAX5 se induce en los progenitores intermediarios mieloides en respuesta a ambos ligandos. Estos resultados evidencian la distinta capacidad de señalización de JAG1 y DLL1 en los progenitores CD123⁺p, que se traduciría en la regulación específica de un programa genético selectivo de un linaje celular. Pretendemos en el futuro ampliar este estudio a otros genes cuya implicación directa en el desarrollo de pDCs ya ha sido demostrada, tales como E2-2 (Nagasawa et al., 2008) e IRF8 (Esashi et al., 2008; Schiavoni et al., 2002) para corroborar nuestra hipótesis y emprender estudios *in vivo* que puedan subrayar la relevancia de nuestros hallazgos *in vitro*.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En el timo humano residen pDCs y cDCs inmaduras y una población CD123^{lo} CD13⁻ con fenotipo similar al de pDCs activadas. Las pDCs, al contrario que las cDCs, son incapaces de activarse y sobrevivir en respuesta a TSLP, pero lo hacen en respuesta a CD40L e IL-3.
2. Las pDCs intratímicas activadas adquieren potencial tolerogénico y son capaces de inducir la generación de células Treg funcionales tanto alogénicas como autólogas.
3. Las pDCs y cDCs intratímicas activadas promueven la diferenciación de dos subtipos funcionales de nTregs autólogas con patrones diferentes de producción de citoquinas. La generación de ambos subtipos implica la señalización por la vía de CD28-CD86/CD80, pero no por la vía de ICOS-ICOSL.
4. Los progenitores de las células nTreg del timo humano residen selectivamente en la población de timocitos DP CD69^{hi} TCR^{hi}, activados como consecuencia del proceso de selección positiva. Estos progenitores requieren la participación selectiva de células pDCs o cDCs maduras para inducir su diferenciación.
5. La activación de los progenitores nTreg vía TCR induce la expresión de CD40L. Estos progenitores CD40L⁺ son capaces de inducir la activación de pDCs intratímicas autólogas, lo que sugiere un diálogo funcional mediado por CD40-CD40L, ilustrado por las interacciones pDC-nTreg detectadas en la médula tímica *in vivo*.
6. Las pDCs y cDCs se diferencian simultáneamente a partir de progenitores multipotenciales intratímicos a través de un progenitor intermediario con características fenotípicas y genotípicas mieloides, que se ha separado de la ruta de diferenciación intratímica mayoritaria y ha perdido el potencial pro-T.

7. Los efectos funcionales de la activación de Notch en los progenitores multipotenciales intratímicos son específicos de ligando: DLL1 inhibe la generación de los progenitores mieloides de las pDCs y cDCs y, por tanto, la generación de ambos tipos celulares, mientras que JAG1 es permisivo.

8. Una vez los progenitores inmediatos de las pDCs y cDCs se han generado, la activación de Notch por DLL1 o JAG1 promueve su supervivencia, pero tiene efectos ligando-específicos en su diferenciación: DLL1 favorece la diferenciación de cDCs sin afectar significativamente la generación de pDCs, mientras que JAG1 promueve la diferenciación de ambos tipos de DCs, aunque más eficientemente la de cDCs.

9. Los progenitores intratímicos mieloides retienen la capacidad de generar células NK, aparentemente idénticas, aunque con diferente dependencia de IL-2, a las diferenciadas a partir de precursores linfoides. La activación de Notch inducida por los ligandos DLL1 y JAG1 inhibe la generación de células NK a partir de sus precursores mieloides.

10. *AIOLOS* y *PAX5*, además de *SPIB*, se inducen selectivamente en las células pDCs del timo humano. Los ligandos de Notch DLL1 y JAG1 transmiten señales diferentes a los progenitores de las DCs: JAG1, pero no DLL1, induce la expresión de *SPIB* y *AIOLOS* en estos precursores, sugiriendo la regulación JAG1-específica por Notch de la expresión de genes implicados en la diferenciación de las pDCs.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Mönch K, Astrand-Grundström I, Sitnicka E, Sasaki Y, and Jacobsen SE. (2001). Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-) Sca1(+) c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. 15: 659-669.

Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M, and Jacobsen SE. (2005). Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*. 121: 295-306.

Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, and Lord GM. (2007). The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*. 148: 32-46.

Aifantis I, Buer J, von Boehmer H, and Azogui O. (1997). Essential role of the pre-T cell receptor in allelic exclusion of the T cell receptor beta locus. *Immunity*. 7: 601-607.

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, and Weissman IL. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 404: 193-197.

Alam R. (1998). A brief review of the immune system. *Prim Care*. 25: 727-738.

Allman D, Dalod M, Asselin-Paturel C, Delale T, Robbins SH, Trinchieri G, Biron CA, Kastner P, and Chan S. (2006). Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood*. 108: 4025-4034.

Anderson KL, Perkin H, Surh CD, Venturini S, Maki RA, and Torbett BE. (2000). Transcription factor PU.1 is necessary for development of thymic and myeloid progenitor-derived dendritic cells. *J Immunol*. 164: 1855-1861.

Annunziato F and Romagnani S. (2009). Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther*. 11: 257.

Apostolou I and von Boehmer H. (2004). In vivo instruction of suppressor commitment in naïve T cells. *J Exp Med*. 199: 1401-1408.

Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, and Boehmer H. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol*. 3: 756-763.

Ardavin C, Wu L, Li CL, and Shortman K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature*. 362: 761-763.

Areschoug T and Gordon S. (2008). Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. *Contrib Microbiol*. 15: 45-60.

Asano M, Toda M, Sakaguchi N, and Sakaguchi, S. (1996). Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med.* 184: 387-396.

Aschenbrenner K, D'Cruz LM, Vollmann ME, Hinterberger M, Emmerich J, Swee LK, Rolink A, and Klein L. (2007). Selection of Foxp3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells. *Nature Immunol.* 8: 351-358.

Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, and Powrie F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibits intestinal inflammation. *J Exp Med.* 190: 995-1004.

Banchereau J and Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. (1998). *Nature.* 392: 245-252.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, and Palucka K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 18: 767-811.

Bautista JL, Lio CW, Lathrop SK, Forbush K, Liang Y, Luo J, Rudensky AY and Hsieh CS. (2009). Intracolon competition limits the fate determination of regulatory T cells in the thymus. *Nat Immunol.* 10: 1038/ni.1739.

Becknell B and Caligiuri MA. (2005). Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol.* 86: 209-239.

Bell JJ and Bhandoola A. (2008). The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature.* 452: 764-768.

Bendriss-Vermare N, Barthélémy C, Durand I, Bruand C, Dezutter-Dambuyant C, Moulian N, Berrih-Aknin S, Caux C, Trinchieri G, and Brière F. (2001). Human thymus contains IFN- α -producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest.* 107: 835-844.

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, White-sell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, and Ochs HD. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 27: 20-21.

Bensinger SJ, Bandeira A, Jordan MS, Caton AJ, and Laufer TM. (2001). Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med.* 194: 427-438.

Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, and Noelle RJ. (2007). All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med.* 204: 1765-1774.

Bergqvist I, Eriksson M, Saarikettu J, Eriksson B, Corneliussen B, Grundström T, and Holmberg D. (2000). The basic helix-loop-helix transcription factor E2-2 is involved in T lymphocyte development. *Eur J Immunol.* 30: 2857-2863.

Bhat NK, Komschlies KL, Fujiwara S, Fisher RJ, Mathieson BJ, Gregorio TA, Young HA, Kasik JW, Ozato K, and Papas TS. (1989). Expression of ets genes in mouse thymocyte subsets and T cells. *J Immunol.* 142: 672-678.

Biassoni R, Ugolotti E, and De Maria A. (2009). NK cell receptors and their interactions with MHC. *Curr Pharm Des.* 15: 3301-3310.

Bigas A, Martin DI, and Milner LA. (1998). Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol Cell Biol.* 18: 2324-2333.

Bigas A, Robert-Moreno A, and Espinosa L. (2010). The Notch pathway in the developing hematopoietic system. *Int J Dev Biol.* 54: 1175-1188.

Bonilla FA and Oettgen HC.(2010). Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 125: S33-40.

Bonomo A, Kehn PJ, Payer E, Rizzo L, Cheever AW, and Shevach EM. (1995). Pathogenesis of post-thymectomy autoimmunity. Role of syngeneic MLR-reactive T cells. *J Immunol.* 154: 6602-6611.

Brocker T, Riedinger M, and Karjalainen K. (1997). Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes *in vivo*. *J Exp Med.* 185: 541-550.

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, and Ramsdell F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 27: 68-73.

Cabarrocas J, Cassan C, Magnusson F, Piaggio E, Mars L, Derbinski J, Kyewski B, Gross DA, Salomon BL, Khazaie K, Saoudi A, and Liblau RS. (2006). Foxp3+ CD25+ regulatory T cells specific for neo-self-antigen develop at the double-positive thymic stage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 8453-8458.

Carotta S, Dakic A, D'Amico A, Pang SHM, Greig KT, Nutt SL, and Wu L. (2010). The transcription factor PU.1 controls dendritic cell development and Flt3 cytokine receptor expression in a dose-dependent manner. *Immunity.* 32: 628-641.

Castillo EF, Stonier SW, Frasca L, and Schluns KS. (2009). Dendritic cells support the *in vivo* development and maintenance of NK cells via IL-15 trans-presentation. *J Immunol.* 183: 4948-4956.

Caton ML, Smith-Raska MR, and Reizis B. (2007). Notch-RBP-J signalling controls the homeostasis of CD8- dendritic cells in the spleen. *J Exp Med.* 204: 1653-1664.

Cayabyab M, Phillips JH and Lanier LL. (1994). CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes. *J Immunol.* 152: 1523-1531.

Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, and Colonna M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive potent Th1 polarization. *Nat Immunol.* 1: 305-310.

Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, and Bowcock AM. (2000). JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest.* 106: R75-R81.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, Mc Grady G, and Washl SM. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naïve T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 198: 1875-1886.

Cheng M, Charoudeh HN, Brodin P, Tang Y, Lakshmikanth T, Höglund P, Jacobsen SE, and Sitnicka E. (2009). Distinct and overlapping patterns of cytokine regulation of thymic and bone marrow-derived NK cell development. *J Immunol.* 182: 1460-1468.

Cheng P, Nefedova Y, Corzo CA, and Gabrilovich DI. (2007). Regulation of dendritic-cell differentiation by bone marrow stroma via different Notch ligands. *Blood.* 109: 507-515.

Cheng P, Nefedova Y, Miele L, Osborne BA, and Gabrilovich D. (2003). Notch signaling is necessary but not sufficient for differentiation of dendritic cells. *Blood.* 102: 3980-3988.

Chicha L, Jarrossay D, and Manz MG. (2004). Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations. *J Exp Med.* 200: 1519-1524.

Ciofani M, Schmitt TM, Ciofani A, Michie AM, Cuburu N, Aublin A, Maryanski JL, and Zúñiga-Pflücker JC. (2004). Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J Immunol.* 172: 5230-5239.

Cochrane SW, Zhao Y, Welner RS, and Sun XH. (2009). Balance between Id and E proteins regulates myeloid-versus-lymphoid lineage decisions. *Blood.* 113: 1016-1026.

Colonna M, Trinchieri G, and Liu YJ. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol.* 5: 1219-1226.

Coobold SP, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L, Humm S, and Waldmann H. (2004). Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol.* 172: 6003-6010.

Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, and Powrie F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med.* 204: 1757-1764.

Corcoran L, Ferrero I, Vremec D, Lucas K, Waithman J, O'Keeffe M, Wu L, Wilson A, and Shortman K. (2003). The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. *J Immunol.* 170: 4926-4932.

Cruz-Adalia A, Jiménez-Borreguero LJ, Ramírez-Huesca M, Chico-Calero I, Barreiro O, López-Conesa E, Fresno M, Sánchez-Madrid F, and Martín P. (2010). CD69 limits the severity of cardiomyopathy after autoimmune myocarditis. *Circulation.* 122: 1396-1404.

Curotto de Lafaille MA, and Lafaille JJ. (2009). Natural and Adaptive Foxp3+ regulatory T cells: More of the same or a division of labor?. *Immunity.* 30: 626-635.

- Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, and Lafaille JJ. (2008). Adapative Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity*. 29: 114-126.
- Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, and Lafaille JJ. (2004). CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol*. 173: 7259-7268.
- D'Souza B, Meloty-Kapella L, and Weinmaster G. (2010). Canonical and non-canonical notch ligands. *Curr Top Dev Biol*. 92: 73-129.
- D'Souza B, Miyamoto A, and Weinmaster G. (2008). The many facets of Notch ligands. *Oncogene*. 27: 5148-5167.
- de la Pompa JL. (2009). Notch signaling in cardiac development and disease. *Pediatr Cardiol*. 30: 643-650.
- de Pooter RF, Schmitt TM, de la Pompa JL, Fujiwara Y, Orkin SH, and Zúñiga-Pflücker JC. (2006). Notch signaling requires GATA-2 to inhibit myelopoiesis from embryonic stem cells and primary hemopoietic progenitors. *J Immunol*. 176: 5267-5275.
- de Yébenes VG, Carrasco YR, Ramiro AR, and Toribio ML. (2002). Identification of a myeloid intrathymic pathway of dendritic cell development marked by the expresión of the granulocyte macrophage-colony-stimulating factor receptor. *Blood*. 99: 2948-2956.
- del Hoyo GM, Martín P, Vargas HH, Ruiz S, Arias CF, and Ardavín C. (2002). Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature*. 415: 1043-1047.
- Del Prete G. (1998). The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int Rev Immunol*. 16: 427-455.
- Di Santo JP and Vosshenrich CA. (2006). Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. *Immunol Rev*. 214: 35-46.
- Domínguez PM and Ardavín C. (2010). Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev*. 234:90-104.
- Dontje W, Schotte R, Cupedo T, Nagasawa M, Scheeren F, Gimeno R, Spits H, and Blom B. (2006). Delta-like1-induced Notch1 signaling regulates the human plasmacytoid dendritic cell versus T-cell lineage decision through control of GATA-3 and Spi-B. *Blood*. Mar 15;107: 2446-2452.
- Dudley DJ. (1992). The immune system in health and disease. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 6: 393-416.
- Dunkelberger JR and Song WC. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*. 20: 34-50.
- Dzionek A, Funchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, and Schmitz J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for dictinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol*. 165: 6037-6046.

Egen JG, Kuhns MS, and Allison JP. (2002). CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol.* 3: 611-618.

Esashi E, Wang YH, Perng O, Qin XF, Liu YJ, and Watowich SS. (2008). The signal transducer STAT5 inhibits plasmacytoid dendritic cell development by suppressing transcription factor IRF8. *Immunity.* 28: 509-520.

Esparza EM, and Arch RH. (2006). Signaling triggered by glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene: regulation at the interface between regulatory T cells and immune effector cells. *Front Biosci.* 11: 1448-1465.

Farag SS, and Caligiuri MA. (2006). Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* 20:123-137.

Feito MJ, Vaschetto R, Criado G, Sánchez A, Chiocchetti A, Jiménez-Periáñez A, Dianzani U, Portoles P, and Rojo JM. (2003). Mechanism of H4/ICOS costimulation: effects on proximal TCR signals and MAP Kinase pathways. *Eur J Immunol.* 33: 204-214.

Fohrer H, Audit IM, Sainz A, Schmitt C, Dezutter-Dambuyant C, and Dalloul AH. (2004). Analysis of transcription factors in thymic and CD34+ progenitor-derived plasmacytoid and myeloid dendritic cells: evidence for distinct expression profiles. *Exp Hematol.* 32:104-12.

Fontenot JD and Rudensky AY. (2005c). A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol.* 6: 331-337.

Fontenot JD, Gavin MA, and Rudensky AY. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 4: 330-336.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavín MA, and Rudensky AY. (2005a). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* 6: 1142-1151.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, and Rudensky AY. (2005b). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 22: 329-341.

Fuleihan R, Ahern D, and Geha RS. (1995). CD40 ligand expression is developmentally regulated in human thymocytes. *Clin Immunol Immunopathol.* 76: 52-58.

Galy A, Christopherson I, Ferlazzo G, Liu G, Spits H and Georgopoulos K. (2000). Distinct signals control the hematopoiesis of lymphoid-related dendritic cells. *Blood.* 95: 128-137.

García-Peydró M, de Yébenes VG, and Toribio ML. (2006). Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates. *J Immunol.* 177: 3711-3720.

Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, and Rudensky AY. (2007). Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature.* 445: 771-775.

Geissmann F, Prost C, Monnet JP, Dy M, Brousse N, and Hermine O. (1998). Transforming growth factor beta 1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and

interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med*. 187: 961-966.

Gilliet and Liu YJ. (2002). Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T regulatory cells. *Hum Immunol*. 63: 1149-1155.

Godfrey WR, Ying G. Ge, Darrin J Spoden, Bruce L Levine, Carl H June, Bruce R Blazar, and Stephen B Porter. (2004). In vitro-expanded human CD4+CD25+ T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic cell-stimulated MLR cultures. *Blood*. 104: 453-461.

González-García S, García-Peydró M, Martín-Gayo E, Ballestar E, Esteller M, Bornstein R, de la Pompa JL, Ferrando AA, and Toribio ML. (2009). CSL-MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage specific IL7-R α gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. *J Exp Med*. 206: 779-791.

Gordon WR, Arnett KL, and Blacklow SC. (2008). The molecular logic of Notch signalling-a structural and biochemical perspective. *J Cell Sci*. 121: 3109-3119.

Goubier A, Dubois B, Gheit H, Joubert G, Villard-Truc F, Asselin-Paturel C, Trinchieri G, and Kaiserlian D. (2008). Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity*. 29: 464-475.

Green EA, Gorelik L, McGregor CM, Tran EH, and Flavell RA. (2003). CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF- β -TGF- β receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 10878-10883.

Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, and Liu YJ. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40L. *J Exp Med*. 185: 1101-1111.

Guerriero A, Langmuir PB, Spain LM, and Scott EW. (2000). PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells. *Blood*. 95: 879-885.

Guimond M, Freud AG, Mao HC, Yu J, Blaser BW, Leong JW, Vandeusen JB, Dorrance A, Zhang J, Mackall CL, and Caligiuri MA. (2010). In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis. *J Immunol*. 184: 2769-2775.

Hanabuchi S, Ito T, Park WR, Watanabe N, Shaw JL, Roman E, Arima K, Wang YH, Voo KS, Cao W, and Liu YJ. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol*. 184: 2999-3007.

Hao QL, George AA, Zhu J, Barsky L, Zielinska E, Wang X, Price M, Ge S, and Crooks GM. (2008). Human intrathymic lineage commitment is marked by differential CD7 expression: identification of CD7- lympho-myeloid thymic progenitors. *Blood*. 111: 1318-1326.

He R and Geha RS. (2010). Thymic stromal lymphopoietin. *Ann N Y Acad Sci*. 1183: 13-24.

Heinzel K, Benz C, Martins VC, Haidl ID, and Bleul CC. (2007). Bone marrow-derived hemopoietic precursors commit to the T cell lineage only after arrival in the thymic microenvironment. *J Immunol*. 178: 858-868.

Ho IC, Vorhees P, Marin N, Oakley BK, Tsai SF, Orkin SH, and Leiden JM. (1991). Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T cell receptor alpha gene. *EMBO J.* 10: 1187-1192.

Höglund P and Brodin P. (2010). Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat Rev Immunol.* [Epub ahead of print]

Hogquist KA and Moran AE. (2009). Treg cells meet their limit. *Nat Immunol.* 10: 565-566.

Hori S, Nomura T, and Sakaguchi S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 299: 1057-1061.

Horwitz DA, Zheng SG, and Gray JD. The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4⁺ CD25⁺ and CD8⁺ regulatory T cell subsets. *J Leukoc Biol.* (2003). 74: 471-478.

Hosoya T, Kuroha T, Moriguchi T, Cummings D, Maillard I, Lim KC, and Engel JD. (2009). GATA-3 is required for early T lineage progenitor development. *J Exp Med.* 206: 2987-3000.

Hozumi K, Negishi N, Suzuki D, Abe N, Sotomaru Y, Tamaoki N, Mailhos C, Ish-Horowicz D, Habu S, and Owen MJ. (2004). Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat Immunol.* 5: 638-644.

Hsieh CS, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D, and Rudensky AY. (2004). Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺CD4⁺ T cell receptors. *Immunity.* 21: 267-277.

Hsieh CS, Zheng Y, Liang Y, Fontenot JD, and Rudensky AY. (2006). An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol.* 7: 401-410.

Ishikawa F, Niino H, Iino T, Yoshida S, Saito N, Onohara S, Miyamoto T, Minagawa H, Fujii S, Shultz LD, Harada M, and Akashi K. (2007). The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood.* 110: 3591-3660.

Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, Qin FX, Gilliet M, and Liu YJ. (2008). Two functional subsets of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity.* 28: 870-880.

Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA, Qin XF, Liu YJ, and Gilliet M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med.* 204: 105-115.

Jaleco AC, Neves H, Hooijberg E, Gameiro P, Clode N, Haury M, Henrique D, and Parreira L. (2001). Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J Exp Med.* 194: 991-1001.

Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, and Israel A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature.* 377: 355-358.

- Jenkinson EJ, Owen JJ, and Aspinall R. (1980). Lymphocyte differentiation and major histocompatibility complex antigen expression in the embryonic thymus. *Nature*. 284: 177-179.
- Jesus AA, Duarte AJ, and Oliveira JB. (2008). Autoimmunity in hyper-IgM syndrome. *J Clin Immunol*. 28: S62-S66.
- Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Naji A, and Caton AJ. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*. 2: 301-306.
- Josefowicz SZ and Rudensky AY. (2009). Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity*. 30: 616-625.
- Kageyama R, Ohtsuka T, and Kobayashi T. (2007). The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development*. 134: 1243-1251.
- Karanu FN, Yuefei L, Gallacher I, Sakano S, and Bhatia M. (2003). Differential response of primitive human CD34- and CD34+ hematopoietic cells to the Notch ligand Jagged-1. *Leukemia*. 17: 1366-1374.
- Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL, and Manz MG. (2003). Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 198: 305-313.
- Kawamura T and Furue M. (1995). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 expression in Langerhans cells: differential regulation by T helper type 1 and T helper type 2 cytokines. *Eur J Immunol*. 25: 1913-1917.
- Kee BL. (2009). E and Id proteins branch out. *Nat Rev Immunol*. 9: 175-184.
- Khattari R, Cox T, Yasayko SA, and Ramsdell F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*. 4: 337-342.
- Kisielow P and von Boehmer H. (1990). Negative and positive selection of immature thymocytes: timing and the role of the ligand for alpha beta T cell receptor. *Semin Immunol*. 2: 35-44.
- Koch U and Radtke F. (2010). Notch signaling in solid tumors. *Curr Top Dev Biol*. 92: 411-455.
- Koch U, Fiorini E, Benedito R, Besseyrias V, Schuster-Gossler K, Pierres M, Manley NR, Duarte A, Macdonald HR, and Radtke F. (2008). Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J Exp Med*. 205: 2515-2523.
- Kondo M, Scherer DC, King AG, Manz MG and Weissman IL. (2001). Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 11: 520-526.
- Kondo M, Weissman IL, and Akashi K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 91: 661-672.

Kopan R and Ilagan MX. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 137: 216-233.

Kumano K, Chiba S, Kunisato A, Sata M, Saito T, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Masuda S, Shimizu K, Takahashi T, Ogawa S, Hamada Y, and Hirai H. (2003). Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity*. 18: 699-711.

Kumanogoh A, Wang X, Lee I, Watanabe C, Kamanaka M, Shi W, Yoshida K, Sato T, Habu S, Itoh M, Sakaguchi N, Sakaguchi S, and Kikutani H. (2001). Increased T cell autoreactivity in the absence of CD40-CD40 ligand interactions: a role of CD40 in regulatory T cell development. *J Immunol*. 166: 353-360.

Kunisato A, Chiba S, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Saito T, Masuda S, Yamaguchi T, Osawa M, Kageyama R, Nakauchi H, Nishikawa M, Hirai H. (2003). HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. *Blood*. 101:1777-83.

Ladi E, Schwickert TA, Chtanova T, Chen Y, Herzmark P, Yin X, Aaron H, Chan SW, Lipp M, Roysam B, and Robey EA. (2008). Thymocyte-dendritic cell interactions near sources of CCR7 ligands in the thymic cortex. *J Immunol*. 181: 7014-7023.

Lanier LL, Spits H, and Phillips JH. (1992). The developmental relationship between NK cells and T cells. *Immunol Today*. 13: 392-395.

Laouar Y, Welte T, Fu XY, and Flavell RA. (2003). STAT3 is required for FLT3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity*. 19: 903-912.

Larkin J 3rd, Rankin AL, Picca CC, Riley MP, Jenks SA, Sant AJ, and Caton AJ. (2008). CD4+CD25+ regulatory T cell repertoire formation shaped by differential presentation of peptides from a self-antigen. *J Immunol*. 180: 2149-2157.

Lauritsen JPH, Wong GW, Lee SY, Lefebvre JM, Ciofani M, Rhodes M, Kappes DJ, Zúñiga-Pflücker JC, and Wiest DL. (2009). Marked induction of the helix-loop-helix protein Id3 promotes the $\gamma\delta$ T cell fate and renders their functional maturation Notch independent. *Immunity*. 31: 565-575.

Leclercq G, Debacker V, de Smedt M, and Plum J. (1996). Differential effects of interleukin-15 and interleukin-2 on differentiation of bipotential T/natural killer progenitor cells. *J Exp Med*. 184: 325-336.

Lehar SM, Dooley J, Farr AG, and Bevan M. (2005). Notch ligands Delta 1 and Jagged 1 transmit distinct signals to T-cell precursors. *Blood*. 105: 1440-1447.

León B, López-Bravo M, and Ardavín C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity*. 26: 519-531.

León B, Martínez del Hoyo G, Parrillas V, Vargas HH, Sánchez-Mateos P, Longo N, López-Bravo M, and Ardavín C. (2004). Dendritic cell differentiation potential of mouse monocytes: monocytes represent immediate precursors of CD8- and CD8+ splenic dendritic cells. *Blood*. 103: 2668-2676.

- Li J, Park J, Foss D, and Goldschneider I. (2009). Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state. *J Exp Med*. 206: 607-622.
- Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, and Chatila TA. (2007). Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol*. 8: 359-368.
- Lin YW, Nichols RA, Letterio JJ, and Aplan PD. (2006). Notch1 mutations are important for leukemic transformation in murine models of precursor-T leukemia/lymphoma. *Blood*. 107: 2540-2543.
- Lio CW and Hsieh CS. (2008). A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity*. 28: 100-111.
- Liu J, Sato C, Cerletti M, and Wagers A. (2010). Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Top Dev Biol*. 92: 367-409.
- Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, Zhang Q, Lonning S, Teicher BA, and Lee C. (2007). Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol*. 178: 2883-2892.
- Liu YJ. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid cell precursors. *Annu Rev Immunol*. 23: 275-306.
- López-Botet M, Moretta L, and Strominger J. (1996). NK-cell receptors and recognition of MHC class I molecules. *Immunol Today*. 17: 212-4.
- Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, and Diefenbach A. (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*. 26:503-517.
- Ma S, Pathak S, Trinh L, and Lu R. (2008). Interferon regulatory factors 4 and 8 induce the expression of Ikaros and Aiolos to downregulate pre-B cell receptor and promote cell-cycle withdrawal in pre-B-cell development. *Blood*. 111: 1396-1403.
- Magri M, Yatim A, Benne C, Balbo M, Henry A, Serraf A, Sakano S, Gazzolo L, Lévi Y, and Lelièvre JD. (2009). Notch ligands potentiate IL-7-driven proliferation and survival of human thymocyte precursors. *Eur J Immunol*. 39: 1231-1240.
- Mai J, Wang H, and Yang XF. (2010). Th 17 cells interplay with Foxp3+ Tregs in regulation of inflammation and autoimmunity. *Front Biosci*. 15: 986-1006.
- Maillard I, Koch U, Dumortier A, Shestova O, Xu L, Sai H, Pross SE, Aster JC, Bhandoola A, Radtke F, and Pear WS. (2008). Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2: 356-366.
- Manz MG, Traver D, Akashi K, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, and Weissman IL. (2001a). Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Ann N Y Acad Sci*. 938: 167-173.

Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, and Akashi K. (2001b). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*. 97: 3333-3341.

Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, and McKenna HJ. (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med*. 184: 1953-1962.

Márquez C, Trigueros C, Fernández E, and Toribio ML. (1995). The development of T and non-T cell lineages from CD34+ human thymic precursors can be traced by the differential expression of CD44. *J Exp Med*. 181:475-483.

Márquez C, Trigueros C, Franco JM, Ramiro AR, Carrasco YR, López-Botet M, and Toribio ML. (1998). Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood*. 91 (8): 2760-2771

Martín P, Del Hoyo GM, Anjuère F, Arias CF, Vargas HH, Fernández-L A, Parrillas V, and Ardavin C. (2002) Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood*. 100: 383-390.

Martín P, Gómez M, Lamana A, Matesanz Marín AM, Cortés JR, Ramírez-Huesca M, Barreiro O, López-Romero P, Gutiérrez-Vázquez C, de la Fuente H, Cruz-Adalia A, and Sánchez-Madrid F. (2010). The leukocyte activation antigen CD69 limits allergic asthma and skin contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 126: 355-365.

McHeyzer-Williams MG, McHeyzer-Williams LJ, Fanelli Panus J, Bikah G, Pogue-Caley RR, Driver DJ, and Eisenbraun MD. (2000). Antigen-specific immunity. Th cell-dependent B cell responses. *Immunol Res*. 22: 223-236.

McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, Maliszewski CR, Lynch DH, Smith J, Pulendran B, Roux ER, Teepe M, Lyman SD, and Peschon JJ. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood*. 95: 3489-3497.

Mende I, Karsunky H, Weissman IL, Engleman EG, and Merad M. (2006). Flk2⁺ myeloid progenitors are the main source of Langerhans cells. *Blood*. 107: 1383-1390.

Mercher T, Cornejo MG, Sears C, Kindler T, Moore SA, Maillard I, Pear WS, Aster JC, and Gilliland DG. (2008). Notch signaling specifies megakaryocyte development from hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 3: 314-326.

Michon JM, Caligiuri MA, Hazanow SM, Levine H, Schlossman SF, and Ritz J. (1988) Induction of natural killer effectors from human thymus with recombinant IL-2. *J Immunol*. 140: 3660-3667.

Modigliani Y, Bandeira A, and Coutinho A. (1996). A model for developmentally acquired thymus-dependent tolerance to central and peripheral antigens. *Immunol Rev*. 149: 155-220.

Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, and Weissman IL. (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development*. 124: 1929-1939.

- Moser M and Leo O. (2010) Key concepts in immunology. *Vaccine*. 28 Suppl 3: C2-C13.
- Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, and Curotto de Lafaille MA. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest*. 115: 1923-1933.
- Nagasawa M, Schmidlin H, Hazekamp MG, Schotte R, and Blom B. (2008). Development of human plasmacytoid dendritic cells depends on the combined action of the basic helix-loop-helix factor E2-2 and the Ets factor Spi-B. *Eur J Immunol*. 38: 2389-3400.
- Naik SH, Metcalf D, van Nieuwenhuijze A, Wicks I, Wu L, O'Keeffe M, and Shortman K. (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol*. 7: 663-671.
- Naik SH, Sathe P, Park HY, Metcalf D, Proietto AI, Dakic A, Carotta S, O'Keeffe M, Bahlo M, Papenfuss A, Kwak JY, Wu L, and Shortman K. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol*. 8: 1217-1226.
- Neves H, Weerkamp F, Gomes AC, Naber BAE, Gambeiro P, Becker JD, Lúcio P, Clode N, van Dongen JJM, Staal FJT, and Parreira L. (2006). Effects of Delta1 and Jagged1 on early human hematopoiesis: correlation with expression of Notch signalling-related genes in CD34+ cells. *Stem Cells*. 24: 1328-1337.
- Nossal GJ. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell*. 76: 229-239.
- Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, Angeli V, Li Y, Boros P, Ding Y, Jessberger R, Trinchieri G, Lira SA, Randolph GJ, and Bromberg JS. (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol*. 7: 652-662.
- Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, and Baltimore D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*. 248: 1517-1523.
- Ohishi K, Varnum-Finney B, Serda RE, Anasetti C, and Bernstein ID. (2001). The Notch ligand, Delta-1, inhibits the differentiation of monocytes into macrophages but permits their differentiation into dendritic cells. *Blood*. 98: 1402-1407.
- Ohnmacht C, Pullner A, King SB, Drexler I, Meier S, Brocker T, and Voehringer D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med*. 206: 549-559.
- Okada T, Lian ZX, Naiki M, Ansari AA, Ikehara S, and Gershwin ME. (2003). Murine thymic plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 33: 1012-1019.
- Olivier A, Lauret E, Gonin P, and Galy A. (2006). The Notch ligand delta-1 is a hematopoietic development cofactor for plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 107: 2694-2701.
- Onai N, Obata-Onai A, Schimd MA, Ohteki T, Jarrossay D, and Manz MG. (2007). Identification of clonogenic common FLT3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol*. 8: 1207-1216.

Onai N, Obata-Onai A, Tussiwand R, Lanzavecchia A, and Manz MG. (2006). Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development. *J Exp Med*. 203: 227-238.

Pacholczyk R and Kern J. (2008). The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells. *Immunology*. 125: 450-458.

Pacholczyk R, Ignatowicz H, Kraj P, and Ignatowicz L. (2006). Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. *Immunity*. 25: 249-259.

Pear WS, Aster JC, Scott ML, Hasserjian RP, Soffer B, Sklar J, and Baltimore D. (1996). Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med*. 183: 2283-2291.

Pelayo R, Hirose J, Huang J, Garrett KP, Delogu A, Busslinger M, and Kincade PW. (2005). Derivation of 2 categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow. *Blood*. 105: 4407-4415.

Pennington DJ, Silva-Santos B, Silberzahn T, Escórcio-Correia M, Woodward MJ, Roberts SJ, Smith AL, Dyson PJ, and Hayday AC. (2006). Early events in the thymus affect the balance of effector and regulatory T cells. *Nature*. 444: 1073-1077.

Pridans C, Holmes ML, Wettenhall MPJM, Dakic A, Corcoran LM, Smyth GK, and Nutt SL. (2008). Identification of Pax5 target genes in early B cell differentiation. *J Immunol*. 180: 1719-1728.

Proietto AI, van Dommelen S, Zhou P, Rizzitelli A, D'Amico A, Steptoe RJ, Naik SH, Lahoud MH, Liu Y, Zheng P, Shortman K, and Wu L. (2008). Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:19869-19874.

Pui JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, Lee JY, Kadesch T, Hardy RR, Aster JC, and Pear WS. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity*. 11: 299-308.

Radtke F, Fasnacht N, and Macdonald HR. (2010). Notch signaling in the immune system. *Immunity*. 32: 14-27.

Ramiro AR, Trigueros C, Márquez C, San Millán JL, and Toribio ML. (1996). Regulation of pre-T cell receptor (pT alpha-TCR beta) gene expression during human thymic development. *J Exp Med*. 184: 519-530.

Randolph GJ, Inaba K, Robbani DF, Steinman RM, and Muller WA. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity*. 11: 753-761.

Reizis B. (2010). Regulation of plasmacytoid dendritic cell development. *Curr Opin Immunol*. 22: 206-211.

Res PC, Couwernberg F, Vyth-Dreese FA, and Spits H. (1999). Expression of pT α mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus. *Blood*. 94: 2647-2657.

Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, and Reid CDL. (1999) Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol.* 29: 2769-2778.

Rodrigues NP, Boyd AS, Fugazza C, May GE, Guo YP, Tipping AJ, Scadden DT, Vyas P, and Enver T. (2008). GATA-2 regulates granulocyte-macrophage progenitor cell function. *Blood.* 112: 4862-4873.

Romagnani S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today.* 18:263-6.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M and Toda M. (1995). Immunological self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 155: 1151-1164.

Sakaguchi S, Takahashi T, and Nishizuka Y. (1982). Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. *J Exp Med.* 156: 1565-1576.

Sakata-Yanagimoto M, Nakagami-Yamaguchi E, Saito T, Kumano K, Yasutomo K, Ogawa S, Kurokawa M, and Chiba S. (2008). Coordinated regulation of transcription factors through Notch2 is an important mediator of mast cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 7839-7844.

Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, and Bluestone JA. (2000). B7/ CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 12: 431-440.

Sánchez MJ, Muench MO, Roncarolo MG, Lanier LL, and Phillips JH. (1994). Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med.* 180: 569-576.

Sandy AR and Maillard I. (2009). Notch signaling in the hematopoietic system. *Expert Opin Biol Ther.* 9: 1383-1398.

Sansom DM and Walker LS. (2006). The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunol Rev.* 212: 131-148.

Scehnet JS, Jiang W, Kumar SR, Krasnoperov V, Trindade A, Benedito R, Djokovic D, Borges C, Ley EJ, Duarte A, and Gill PS. (2007). Inhibition of Dll4-mediated signalling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Bood.* 109: 4753-4760.

Schiavoni G, Mattei F, Sestilli P, Borghi P, Venditti M, Morse HC 3rd, Belardelli F, and Gabriele L. (2002). ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells. *J Exp Med.* 196: 1415-1425.

Schmitt C, Tonnelle C, Dalloul A, Chabannon C, Debré P, and Rebollo A. (2002). Aiolos and Ikaros: regulators of lymphocyte development, homeostasis and lymphoproliferation. *Apoptosis.* 7:277-284.

Schmitt TM and Zúñiga-Pflücker JC. (2002). Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity.* 17: 749-756.

Schotte R, Nagasawa M, Weijer K, Spits H, and Blom B. (2004). The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *J Exp Med*. 200: 1503-1509.

Schotte R, Rissoan MC, Bendriss-Vermare N, Bridon JM, Duhon T, Weijer K, Brière F, and Spits H. (2003). The transcription factor Spi-B is expressed in plasmacytoid DC precursors and inhibits T-, B-, and NK-cell development. *Blood*. 101: 1015-1023.

Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, and Fazekas de St. Groth B. (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 203: 1693-1700.

Shawber CJ, Das I, Francisco E, and Kitajewski J. (2003). Notch signaling in primary endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci*. 995:162-170.

Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, and Thornton AM. (2001). Control of T-cell activation by CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol Rev*. 182: 58-67.

Shevach EM. (2002). CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*. 2: 389-400.

Shigematsu H, Reizis B, Iwasaki H, Mizuno S, Hu D, Traver D, Leder P, Sakaguchi N, and Akashi K. (2004). Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity*. 21: 43-53.

Shimizu K, Chiba S, Hosoya N, Kumano K, Saito T, Kurokawa M, Kanda Y, Hamada Y, and Hirai H. (2000a). Binding of Delta1, Jagged1, and Jagged2 to Notch2 rapidly induces cleavage, nuclear translocation, and hyperphosphorylation of Notch2. *Mol Cell Biol*. 20: 6913-6922.

Shimizu K, Chiba S, Saito T, Kumano K, and Hirai H. (2000b). Physical interaction of Delta1, Jagged1, and Jagged2 with Notch1 and Notch3 receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 276: 385-389.

Shojaei F, Trowbridge J, Gallacher L, Yuefei L, Goodale D, Karanu F, Levac K, and Bhatia M. (2005). Hierarchical and ontogenic positions serve to define the molecular basis of human hematopoietic stem cell behavior. *Dev Cell*. 8: 651-663.

Shortman K and Liu YJ. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Rev*. 2: 151-161.

Shortman K and Wu L. (1996). Early T lymphocyte progenitors. *Annu Rev Immunol*. 14: 29-47.

Shortman K, Wu L, Süss G, Kronin V, Winkel K, Saunders D, and Vremec D. (1997). Dendritic cells and T lymphocytes: developmental and functional interactions. *Ciba Found Symp*. 204: 130-138; discussion 138-141.

Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, and Liu YJ. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 284: 1835-1837.

Sims JE, Williams DE, Morrissey PJ, Garka K, Foxworthe D, Price V, Friend SL, Farr A, Bedell MA, Jenkins NA, Copeland NG, Grabstein K, and Paxton RJ. (2000). Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. *J Exp Med*. 192: 671-680.

Singh N, Phillips RA, Iscove NN, and Egan SE. (2000). Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis. *Exp Hematol*. 28: 527-534.

Spangrude GJ, Heimfeld S and Weissman IL. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 241: 58-62.

Spence PJ and Green EA. Foxp3⁺ regulatory T cells promiscuously accept thymic signals critical for their development. (2008). *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 973-978.

Spits H, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, and Uittenbogaart CH. (2000). Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med*. 192:1775-1784.

Sprent J, Lo D, Gao EK, and Ron Y. (1988). T cell selection in the thymus. *Immunol Rev*. 101: 173-190.

Srahna M, Remacle JE, Annamalai K, Pype S, Huylebroeck D, Boogaerts MA, and Vandenberghe P. (2001). NK-Kappa B is involved in the regulation of CD154 (CD40 ligand) expression in primary human T cells. *Clin Exp Immunol*. 125: 229-236.

Steinman RM, Hawiger D, and Nussenzweig MC. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 109: 685-711.

Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immogenicity. *Annu Rev Immunol*. 9: 271-296.

Strobl H, Scheinecker C, Riedl E, Csmarits B, Bello-Fernandez C, Pickl WF, Majdic O, and Knapp W. (1998). Identification of CD68⁺lin⁻ peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *J Immunol*. 161: 740-748.

Su GH, Chen HM, Muthusamy N, Garrett-Sinha LA, Baunoch D, Tenen DG, and Simon MC. (1997). Defective B cell receptor-mediated responses in mice lacking the Ets protein, Spi-B. *EMBO J*. 16: 7118-7129.

Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, and Belkaid Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 Treg cells via retinoic acid. *J Exp Med*. 204: 1775-1785.

Taghon T, Van de Walle I, De Smet G, De Smedt M, Leclercq G, Vandekerckhove B, and Plum J. (2009). Notch signaling is required for proliferation but not for differentiation at a well-defined beta-selection checkpoint during human T-cell development. *Blood*. 113: 3254-3263.

- Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, and Singer A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol.* 6: 152-162.
- Tamura T, Taylor P, Yamaoka K, Kong HJ, Tsujimura H, O'Shea JJ, Singh H, and Ozato K. (2005). IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity. *J Immunol.* 174: 2573-2581.
- Tang Q and Bluestone JA. (2006). Plasmacytoid DCs and T(reg) cells: casual acquaintance or monogamous relationship?. *Nat Immunol.* 7: 551-553.
- Thornton AM and Shevach EM. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 188: 287-296.
- Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, and Weissman IL. (2000). Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science.* 290: 2152-2154.
- Trigueros C, Ramiro AR, Carrasco YR, de Yebenes VG, Albar JP, and Toribio ML. (1998). Identification of a late stage of small noncycling pTalpha-pre-T cells as immediate precursors of T cell receptor alpha/beta+ thymocytes. *J Exp Med.* 188: 1401-1412.
- Tsujimura H, Tamura T, and Ozato K. (2003). Cutting edge: IFN consensus sequence binding protein/ IFN regulatory factor 8 drives the development of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 170: 1131-1135
- Tuovinen H, Pekkarinen PT, Rossi LH, Mattila I, and Arstila TP. (2008). The FOXP3+ subset of human CD4+CD8+ thymocytes is immature and subject to intrathymic selection. *Immunol Cell Biol.* 86: 523-529.
- Uyttendaele H, Closson V, Wu G, Roux F, Weinmaster G, and Kitajewski J. (2000). Notch4 and Jagged-1 induce microvessel differentiation of rat brain endothelial cells. *Microvasc Res.* 60: 91-103.
- Van de Walle I, De Smet G, De Smedt M, Vandekerckhove B, Leclercq G, Plum J, and Taghon T. (2009). An early decrease in Notch activation is required for human TCR-alphabeta lineage differentiation at the expense of TCR-gammadelta T cells. *Blood.* 113: 2988-2998.
- Van Meerwijk JP, Marguerat S, Lees RK, Germain RN, Fowlkes BJ, and MacDonald HR. (1997). Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J Exp Med.* 185: 377-383.
- van Santen HM, Beoist C, and Mathis D. (2004). Number of Treg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med.* 200: 1221-1230.
- Vandenabeele S, Hochrein H, Mavaddat N, Winkel K, and Shortman K. (2001). Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood.* 97: 1733-1741.

Vang KB, Yang J, Mahmud SA, Burchill MA, Vegoe AL, and Farrar MA. (2008). IL-2, 7 and 15, but not thymic stromal lymphopoietin, reducdantly govern CD4+ Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol.* 181: 3285-3290.

Vanhecke D, Verhasselt B, De Smedt M, Leclercq G, Plum J, and Vandekerckhove B. (1997). Human thymocytes become lineage committed at an early postselection CD69+ stage, before the onset of functional maturation. *J Immunol.* 159: 5973-5983.

Varol C, Vallon-Eberhard A, Elinav E, Aychek T, Shapira Y, Luche H, Fehling HJ, Hardt WD, Shakhar G, and Jung S. (2009). Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity.* 31: 502-512.

Vercauteren SM and Sutherland HJ. (2004). Constitutively active Notch4 promotes early human hematopoietic progenitor cell maintenance while inhibiting differentiation and causes lymphoid abnormalities in vivo. *Blood.* 104: 2315-2322.

Vosshenrich CA, García-Ojeda ME, Samson-Villéger SI, Pasqualetto V, Enault L, Richard-Le Goff O, Corcuff E, Guy-Grand D, Rocha B, Cumano A, Rogge L, Ezine S, and Di Santo JP. (2006). A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol.* 7: 1217-1224

Vosshenrich CA, Ranson T, Samson SI, Corcuff E, Colucci F, Rosmaraki EE, and Di Santo JP. (2005). Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *J Immunol.* 174: 1213-1221.

Wada H, Masuda K, Satoh R, Kakugawa K, Ikawa T, Katsura Y, and Kawamoto H. (2008). Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature.* 452: 768-772.

Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breitmayer JP, Cottrez F, and Groux H. (2003). Characterization of Dendritic Cells that Induce Tolerance and T Regulatory 1 Cell Differentiation In Vivo. *Immunity.* 18: 605-617.

Wan YY and Flavell RA. (2007). Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. 445: 766-770.

Wan YY. (2010). Multi-tasking of helper T cells. *Immunology.* 130: 166-71.

Wang H, Lee CH, Qi C, Tailor P, Feng J, Abbasi S, Atsumi T, and Morse HC 3rd. (2008). IRF8 regulates B-cell lineage specification, commitment, and differentiation. *Blood.* 112: 4028-4038.

Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, and Liu YJ. (2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature.* 436: 1181-1185.

Weijer K, Uittenbogaart CH, Voordouw A, Couwenberg F, Seppen J, Blom B, Vyth-Dreese FA, and Spits H. (2002). Intrathymic and extrathymic development of human plasmacytoid dendritic cell precursors in vivo. *Blood.* 99: 2752-2759.

Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, and Aster JC. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 306: 269-271.

Williams NS, Klem J, Puzanov IJ, Sivakumar PV, Schatzle JD, Bennett M, and Kumar V. (1998). Natural killer cell differentiation: insights from knockout and transgenic mouse models and in vitro systems. *Immunol Rev*. 165: 47-61.

Wirnsberger G, Mair F, and Klein L. (2009). Regulatory T cell differentiation of thymocytes does not require a dedicated antigen-presenting cell but is under T cell-intrinsic developmental control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 10278-10283.

Witt CM, Raychaudhuri S, Schaefer B, Chakraborty AK, and Robey EA. (2005). Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time. *PLoS Biol*. 3: e160.

Wong J, Obst R, Correia-Neves M, Losyev G, Mathis D, and Beonist C. (2007). Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and nonregulatory CD4+T cells. *J Immunol*. 178: 7032-7041.

Wu L and Liu YJ. (2007). Development of dendritic-cell lineages. *Immunity*. 26: 741-750.

Wu L and Shortman K. (2005). Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol*. 17: 304-12.

Wu L, D'Amico A, Hochrein H, O'Keeffe M, Shortman K and Lucas K. (2001). Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood*. 98: 3376-3382.

Wu L, Nichogiannopoulou A, Shortman K, and Georgopoulos K. (1997). Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity*. 7: 483-492.

Young JW and Steinman RM. (1996). The hematopoietic development of dendritic cells: a distinct pathway for myeloid differentiation. *Stem Cells*. 14: 376-387.

Young LJ, Wilson NS, Schnorrer P, Proietto A, ten Broeke T, Matsuki Y, Mount AM, Belz GT, O'Keeffe M, Ohmura-Hoshino M, Ishido S, Stoorvogel W, Heath WR, Shortman K, and Villadangos JA. (2008). Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol*. 9: 1244-1252.

Yuan JS, Kousis PC, Suliman S, Visan I, and Guidos CJ. (2010). Functions of Notch signalling in the immune system: consensus and controversies. *Annu Rev Immunol*. 28: 343-365.

Zheng SG, Wang JH, Stohl W, Kim KS, Gray JD, and Horwitz DA. (2006). TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J Immunol*. 176: 3321-3329.

Zhou L, Li LW, Yan Q, Petryniak B, Man Y, Su C, Shim J, Chervin S, and Lowe JB. (2008). Notch-dependent control of myelopoiesis is regulated by fucosylation. *Blood*. 112: 308-319.

ANEXO

El trabajo desarrollado durante esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Dominguez-Soto A, Aragonese-Fenoll L, **Martín-Gayo E**, Martinez-Prats L, Colmenares M, Naranjo-Gomez M, Borrás FE, Muñoz P, Zubiaur M, Toribio ML, Delgado R, and Corbí AL. (2007). The DC-SIGN-related lectin LSECtin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells. *Blood*. 109: 5337-5345.
- González-García S, García-Peydró M, **Martín-Gayo E**, Ballestar E, Esteller M, Bornstein R, de la Pompa JL, Ferrando AA, and Toribio ML. (2009). CSL-MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage-specific IL-7R α gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. *J Exp Med*. 206: 779-791.
- **Martín-Gayo E**, Sierra-Filardi E, Corbí AL, and Toribio ML. (2010). Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood*. 115: 5366-5375.
- Puig-Kröger A, Aguilera-Montilla N, Martínez-Núñez R, Domínguez-Soto A, Sánchez-Cabo F, **Martín-Gayo E**, Zaballos A, Toribio ML, Groner Y, Ito Y, Dopazo A, Corcuera MT, Alonso Martín MJ, Vega MA, and Corbí AL. (2010). The novel RUNX3/p33 isoform is induced upon monocyte-derived dendritic cell maturation and downregulates IL-8 expression. *Immunobiology*. 215: 812-820.